

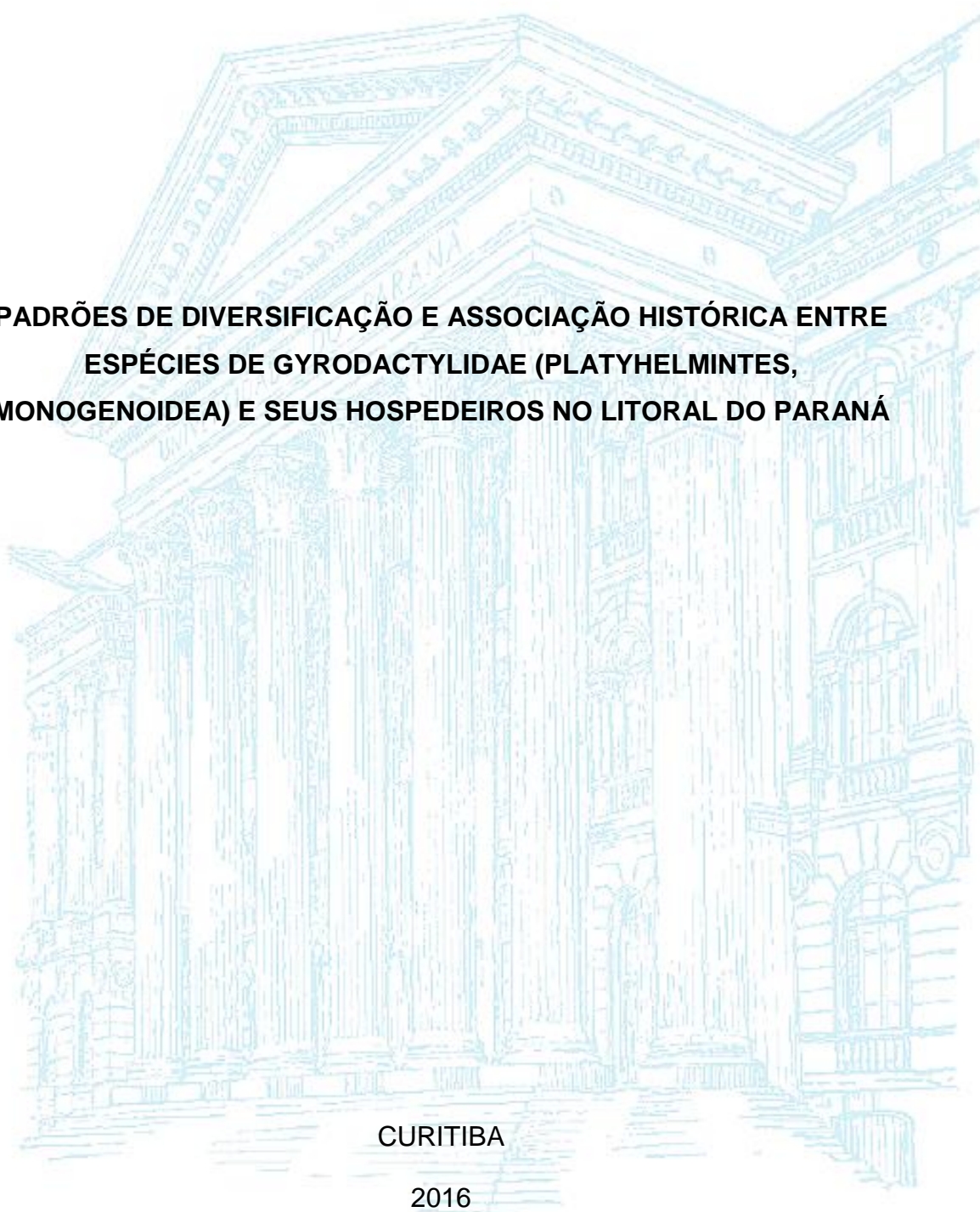
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCIANA PATELLA DE AZAMBUJA

**PADRÕES DE DIVERSIFICAÇÃO E ASSOCIAÇÃO HISTÓRICA ENTRE
ESPÉCIES DE GYRODACTYLIDAE (PLATYHELMINTES,
MONOGENOIDEA) E SEUS HOSPEDEIROS NO LITORAL DO PARANÁ**

CURITIBA

2016



LUCIANA PATELLA DE AZAMBUJA

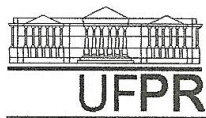
Padrões de Diversificação e Associação Histórica entre espécies de
Gyrodactylidae (Platyhelminthes, Monogeneoidea) e seus hospedeiros no litoral
do Paraná

Tese apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de
Doutora em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Walter A. Boeger, Ph.D.

CURITIBA

2016



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

“Padrões de Diversificação e Associação Histórica entre espécies de Gyrodactylidae (Platyhelminthes, Monogeneoidea) e seus hospedeiros no litoral do Paraná”

por

Luciana Patella de Azambuja

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Walter Antonio Pereira Boeger - Presidente



Prof.ª Dr.ª Sabrina Borges Lino Araújo



Dr.ª Simone Chincz Cohen



Prof.ª Dr.ª Karla Magalhães Campião



Prof.ª Dr.ª Vanete Thomaz Soccol

Curitiba, 04 de maio de 2016.

"Many of the truths that we cling to
depend on our point of view"
(Yoda)

AGRADECIMENTOS

A minha família, minha mãe Márcia, minha irmã Raquel, aos meus queridos avós Cícero e Gilda pelo apoio incondicional, educação, incentivo, cuidado, amor e carinho nesses anos de vida.

Ao meu amor, André, nem sei como agradecer todo o companheirismo, paciência, carinho e incentivo dedicados a mim todos esses anos.

Meu enorme agradecimento ao meu orientador Professor Walter Boeger, por toda a oportunidade e orientação que me foi fornecida ao longo desses muitos anos e principalmente pela amizade. Com certeza sem essa oportunidade eu não estaria aqui, vivendo esse momento tão desejado na minha vida. Obrigada pelo ensinamento, vivência, e por ter colocado a parasitologia em minha vida.

A Professora Maria Regina Boeger, pelo apoio, carinho, amizade e força.

A Valéria Muschner, Sabrina Araújo e Karla Campião, pelas conversas, amizade e apoio.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva, por compartilharem comigo nesses longos anos de laboratório momentos de muito trabalho, coletas e risadas: Alíni, Rafael Baggio, Carol S., Carol M., Daiane, Letícia, Luan, Marcel, Taísa e Emanuel, que além de compartilhar esses momentos, esteve sempre presente prestando socorro para resolver problemas computacionais e análises que sempre travavam. Não esquecendo os que não contemplam mais a nossa companhia no LEMPE: Alessandra, Carol, Diogo, Flávio, José Francisco, Lua, Mariana, Marlus, Patrícia, Raphael Orélis, Renan, Renata, Rodrigo, Rogério e Sandra.

A nossa sempre presente equipe de coleta: André, Adriano, Alessandra, Alíni, Rafael Baggio, Emanuel, Letícia, Marcel, Sandra, Taísa.

Aos queridos amigos, que sempre estiveram ao meu lado, proporcionando momentos de divertimento, lazer e filosóficos.

Ao Dr. Vinicius Abilhoa pelo suporte na identificação das espécies hospedeiras utilizadas no presente estudo.

Ao curso de Pós-graduação de Microbiologia, Parasitologia e Patologia da UFPR, em especial à secretária Lu. Aos professores pelo carinho e atenção.

À CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO GERAL.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUÇÃO GERAL.....	17
Referências.....	24
 Capítulo I. Diversity of Gyrodactylidae in fish hosts of the Paraná Coastal Plain based on morphology and DNA barcoding.....	
Abstract.....	30
Introduction.....	31
Material and Methods.....	33
Collection of biological material.....	33
Morphological processing of parasites.....	35
Molecular Processing.....	35
Distance barcode Analyses.....	36
Results.....	36
Diversity.....	36
Morphology.....	37
Molecular Processing.....	41
Barcode distance Analyses.....	42
Discussion.....	47
References.....	50
 Capítulo II. The Stockholm Paradigm: Phylogeny and Ecology Illuminate the Evolution of <i>Aglaiogyrodactylus</i> (Gyrodactylidae, Monogenoidea).....	
Abstract.....	59
1. Introduction.....	60
2. Material and Methods.....	63
3. Results.....	67
3.1. Ecology from the Parasite Perspective.....	67
3.2. Host Context of Parasite Speciation.....	69
4. Discussion.....	71
4.1. Host Range and Parasite Abundance: Microevolutionary Influence of the Stockholm Paradigm Dynamic.....	72
4.2. Ecology from the Host Perspective.....	74
Final remarks.....	75
References.....	77
 Capítulo III. Testando conceitos subordinados do Paradigma de Estocolmo: associações hospedeiros-parasitas na Baía de Paranaguá.....	
Resumo.....	85
Abstract.....	86
I. Introdução.....	86
II. Material e Métodos.....	92
Material biológico.....	92
Hipóteses, previsões e fundamentação lógica.....	92

Coletas.....	94
Morfologia.....	97
Molecular.....	97
Análise filogenética.....	99
Interações ecológicas.....	100
Reconstrução Histórica.....	102
III. Resultados.....	104
Diversidade e distribuição de hospedeiros.....	104
Diversidade de Gyrodactylidae.....	106
Associações hospedeiros-parasitos: parâmetros ecológicos.....	113
Análise filogenética.....	114
Redes de interações ecológicas.....	118
Espectro de hospedeiros e distância filogenética.....	130
Reconstrução Histórica.....	131
IV. Discussão.....	138
V. Referências.....	147
Considerações Finais.....	156
Referências.....	158

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I.

- Fig. 1.** Map illustrating of the Paraná Coastal Plain. The numbers indicate the studied rivers. 1) Sagrado River, 2) Meio River; 3) Marumbi River; 4) Pinto River; 5) Passa Sete River; 6) Nunes River; 7) Cacatu River; 8) Morato River; 9) Capivari River; 10) Tagaçaba River; 11) Pederneiras River; 12) Bananal River; 13) Brejatuba River; 14) Saci River and 15) Mergulhão River..... 34
- Fig. 2.** Phase contrast photomicrographs of male copulatory organs and haptoral structures of *Aglaioogyrodactylus* spp. (1) Hook of *Aglaioogyrodactylus* sp. n. 4; (2) Anchor of *Aglaioogyrodactylus* sp. n. 4; (3) Hook of *Aglaioogyrodactylus* sp. n. 6; (4) Haptoral structures of *Aglaioogyrodactylus* sp. n. 4; (5) Male copulatory organ of *Aglaioogyrodactylus* sp. n. 2 and (6) Hook of *Aglaioogyrodactylus* sp. n. 2..... 39
- Fig. 3.** Phase contrast photomicrographs of male copulatory organs (MCO) of *Phanerothecium* spp. (1) *Phanerothecium* sp. n. 1; (2) *Phanerothecium* sp. n. 2; (3) *Phanerothecium* sp. n. 4; (4) *Phanerothecium* sp. n. 5, and (5) *Phanerothecium* sp. n. 3..... 40
- Fig. 4.** Phase contrast photomicrographs of the hook structures of *Gyrodactylus* spp. (1) *Gyrodactylus* sp. n. 5; (2) *Gyrodactylus* sp. n. 8, and (3) *Gyrodactylus* sp. n. 9..... 41
- Fig. 5.** Neighbor-joining phylogenetic analysis of the oviparous Gyrodactylidae species, performed based on Maximum Composite Likelihood (Tamura et al. 2004) model for *ITS* rDNA to represent intra- and interspecific distances. (A) indicates the clade formed by *Aglaioogyrodactylus* species with *O. hydaticus* and (B) clade formed by *Phanerothecium* species with *O. sudis*. Bootstrap values (n = 1,000)..... 45
- Fig. 6.** Neighbor-joining phylogenetic analysis of the oviparous Gyrodactylidae species, performed based on Maximum Composite Likelihood (Tamura et al. 2004) model for mtDNA *COII* to represent intra- and interspecific distances. (A) indicates the clade formed by *Aglaioogyrodactylus* species and (B) clade formed by *Phanerothecium* species with *O. sudis*. Bootstrap values (n = 1,000)..... 46
- Fig. 7.** Neighbor-joining phylogenetic analysis of the viviparous Gyrodactylidae species, performed based on Maximum Composite Likelihood (Tamura et al. 2004) model for *ITS* rDNA, to represent distances intra- and interspecific. Bootstrap values (n = 1,000)..... 47
- Fig. 8.** Neighbor-joining phylogenetic analysis of the viviparous Gyrodactylidae species, performed based on Maximum Composite Likelihood (Tamura et al. 2004) model for mtDNA *COII* to represent distances intra- and interspecific. Bootstrap values (n = 1,000)..... 47

Capítulo II.

- Fig. 1.** Phylogenetic and ecological data for *Aglaioogyrodactylus* spp. inhabiting 6 species of loricariid catfishes in the Marumbi River: *Ancistrus multispinis* (A), *H. leucofrenatus* (H), *Rineloricaria* sp. (R), *S. guntheri* (S), *K. lacerta* (K) and *P. splendens* (P). The phylogenetic relationships of the clade of *Aglaioogyrodactylus* spp. (left) is presented with the phylogeny of their hosts

(right), and the observed abundance (histogram) of each parasite species on each host species is presented on the intersection of both phylogenies. Posterior probability values are present by each branch except when equal to 1. Host range evolution is optimized over the parasite tree – colored branch indicate distinct host-range compositions. *Aglaiogyrodactylus cone*i and *A. salebrosus*, that do not occur in that river were included in the analysis to provide a complete evolutionary context.....

68

Fig. 2. Phylogenetic and ecological data for *Aglaiogyrodactylus* spp. inhabiting 6 species of loricariid catfishes in the Marumbi River: *Rineloricaria* sp. (R), *Ancistrus multispinis* (A), *S. guntheri* (S), *H. leucofrenatus* (H), *K. lacerta* (K) and *P. splendens* (P). The phylogenetic relationships of the clade of *Aglaiogyrodactylus* spp. (left) is presented with the phylogeny of their hosts proposed by Lujan et al. (2015) (right), and the observed abundance (histogram) of each parasite species on each host species is presented on the intersection of both phylogenies. Posterior probability values are present by each branch except when equal to 1. Host range evolution is optimized over the parasite tree – colored branch indicate distinct host-range compositions. *Aglaiogyrodactylus cone*i and *A. salebrosus*, that do not occur in that river were included in the analysis to provide a complete evolutionary context.....

69

Capítulo III.

Figura 1. Mapa ilustrando a Baía de Paranaguá. Os números localizam os rios amostrados nesse estudo e suas respectivas microbacias. 1) Rio Sagrado, 2) Rio do Meio, 3) Rio Marumbi, 4) Rio do Pinto, 5) Rio Passa Sete, 6) Rio do Nunes, 7) Rio Cacatu, 8) Rio Morato, 9) Rio Capivari, 10) Rio Tagaça, 11) Rio Pederneiras, 12) Rio Bananal, 13) Rio Brejatuba, 14) Rio Saci e 15) Rio Mergulhão.....

96

Figura 2. Ilustração da riqueza de espécies de Gyrodactylidae encontradas em *A. multispinis*. Os triângulos coloridos representam as diferentes espécies de girodactilídeos identificadas nesse hospedeiro. O “x” indica a(s) microbacia(s) em que esse hospedeiro não foi encontrado.....

107

Figura 3. Ilustração da riqueza de espécies de Gyrodactylidae encontradas em *K. lacerta*. Os triângulos coloridos representam as diferentes espécies de girodactilídeos identificadas nesse hospedeiro. O “x” indica a(s) microbacia(s) em que esse hospedeiro não foi encontrado.....

108

Figura 4. Ilustração da riqueza de espécies de Gyrodactylidae encontradas em *P. cf. azygolechis* e *P. splendens*. Os triângulos coloridos representam as diferentes espécies de girodactilídeos identificadas nesses hospedeiros. O “x” indica a(s) microbacia(s) em que esses hospedeiros não foram encontrados. Na microbacia do rio Guaraguaçu foi encontrada apenas *P. cf. azygolechis*. Nas demais microbacias foram encontrados apenas indivíduos de *P. splendens*.....

109

Figura 5. Ilustração da riqueza de espécies de Gyrodactylidae encontradas em *Rineloricaria* sp.. Os triângulos coloridos representam as diferentes espécies de girodactilídeos identificadas nesse hospedeiro. O “x” indica a(s) microbacia(s) em que esse hospedeiro não foi encontrado.....

110

Figura 6. Ilustração da riqueza de espécies de Gyrodactylidae encontradas em *S. guntheri*. Os triângulos coloridos representam as diferentes espécies de girodactilídeos identificadas nesse hospedeiro. O “x” indica a(s)

microbacia(s) em que esse hospedeiro não foi encontrado. A microbacia sem triângulos ou “x” indica a presença do hospedeiro, mas a ausência de girodactilídeos.....	111
Figura 7. Ilustração da riqueza de espécies de Gyrodactylidae encontradas em <i>S. barbatus</i> . Os triângulos coloridos representam as diferentes espécies de girodactilídeos identificadas nesse hospedeiro. O “x” indica a(s) microbacia(s) em que esse hospedeiro não foi encontrado. A interrogação indica a presença do hospedeiro, mas a não identificação do girodactilídeo.....	112
Figura 8. Ilustração da riqueza de espécies de Gyrodactylidae encontradas em <i>M. microlepis</i> . Os triângulos coloridos representam as diferentes espécies de girodactilídeos identificadas nesse hospedeiro. O “x” indica a(s) microbacia(s) em que esse hospedeiro não foi encontrado. A microbacia que sem triângulos ou “x” indica a presença do hospedeiro, mas a ausência de girodactilídeos. A interrogação indica a presença do hospedeiro, mas a não identificação do girodactilídeo.....	112
Figura 9. Relacionamento filogenético das espécies hospedeiras, baseando-se em dados moleculares concatenados (Cyt-b, COI, RH).....	116
Figura 10. Relacionamento filogenético das espécies de Gyrodactylidae, baseando-se em dados moleculares concatenados (ITS, COII, 18S).....	117
Figura 11. Representação gráfica das interações ecológicas entre as espécies de Gyrodactylidae e seus hospedeiros da microbacia do rio Guaraguaçu, com informações de prevalência de cada interação. Os peixes hospedeiros estão amostrados na filogenia vertical e os parasitos amostrados na filogenia horizontal. Os valores de prevalência representam a presença de relacionamento entre as espécies de Gyrodactylidae e de seus hospedeiros. Os ramos e nomes de espécies em tonalidade escura em cada filogenia representa a presença de cada espécie de hospedeiro e parasito na microbacia, enquanto os mais claros representam a ausência de cada espécie.....	119
Figura 12. Representação gráfica das interações ecológicas entre as espécies de Gyrodactylidae e seus hospedeiros da microbacia do rio Sagrado, com informações de prevalência de cada interação. Os peixes hospedeiros estão amostrados na filogenia vertical e os parasitos amostrados na filogenia horizontal. Os valores de prevalência representam a presença de relacionamento entre as espécies de Gyrodactylidae e de seus hospedeiros. Os ramos e nomes de espécies em tonalidade escura em cada filogenia representa a presença de cada espécie de hospedeiro e parasito na microbacia, enquanto os mais claros representam a ausência de cada espécie.....	120
Figura 13. Representação gráfica das interações ecológicas entre as espécies de Gyrodactylidae e seus hospedeiros da microbacia do rio Nhundiaquara, com informações de prevalência de cada interação. Os peixes hospedeiros estão amostrados na filogenia vertical e os parasitos amostrados na filogenia horizontal. Os valores de prevalência representam a presença de relacionamento entre as espécies de Gyrodactylidae e de seus hospedeiros. Os ramos e nomes de espécies em tonalidade escura em cada filogenia representa a presença de cada espécie de hospedeiro e parasito na microbacia, enquanto os mais claros representam a ausência de cada espécie.....	122

Figura 14. Representação gráfica das interações ecológicas entre as espécies de Gyrodactylidae e seus hospedeiros da microbacia do rio Cacatu, com informações de prevalência de cada interação. Os peixes hospedeiros estão amostrados na filogenia vertical e os parasitos amostrados na filogenia horizontal. Os valores de prevalência representam a presença de relacionamento entre as espécies de Gyrodactylidae e de seus hospedeiros. Os ramos e nomes de espécies em tonalidade escura em cada filogenia representa a presença de cada espécie de hospedeiro e parasito na microbacia, enquanto os mais claros representam a ausência de cada espécie.....	123
Figura 15. Representação gráfica das interações ecológicas entre as espécies de Gyrodactylidae e seus hospedeiros da microbacia do rio Cachoeira, com informações de prevalência de cada interação. Os peixes hospedeiros estão amostrados na filogenia vertical e os parasitos amostrados na filogenia horizontal. Os valores de prevalência representam a presença de relacionamento entre as espécies de Gyrodactylidae e de seus hospedeiros. Os ramos e nomes de espécies em tonalidade escura em cada filogenia representa a presença de cada espécie de hospedeiro e parasito na microbacia, enquanto os mais claros representam a ausência de cada espécie.....	124
Figura 16. Representação gráfica das interações ecológicas entre as espécies de Gyrodactylidae e seus hospedeiros da microbacia do rio Tagaçaba, com informações de prevalência de cada interação. Os peixes hospedeiros estão amostrados na filogenia vertical e os parasitos amostrados na filogenia horizontal. Os valores de prevalência representam a presença de relacionamento entre as espécies de Gyrodactylidae e de seus hospedeiros. Os ramos e nomes de espécies em tonalidade escura em cada filogenia representa a presença de cada espécie de hospedeiro e parasito na microbacia, enquanto os mais claros representam a ausência de cada espécie.....	126
Figura 17. Representação gráfica das interações ecológicas entre as espécies de Gyrodactylidae e seus hospedeiros da microbacia do rio Serra Negra, com informações de prevalência de cada interação. Os peixes hospedeiros estão amostrados na filogenia vertical e os parasitos amostrados na filogenia horizontal. Os valores de prevalência representam a presença de relacionamento entre as espécies de Gyrodactylidae e de seus hospedeiros. Os ramos e nomes de espécies em tonalidade escura em cada filogenia representa a presença de cada espécie de hospedeiro e parasito na microbacia, enquanto os mais claros representam a ausência de cada espécie.....	127
Figura 18. Representação gráfica das interações ecológicas entre as espécies de Gyrodactylidae e seus hospedeiros da microbacia do rio Guaraqueçaba, com informações de prevalência de cada interação. Os peixes hospedeiros estão amostrados na filogenia vertical e os parasitos amostrados na filogenia horizontal. Os valores de prevalência representam a presença de relacionamento entre as espécies de Gyrodactylidae e de seus hospedeiros. Os ramos e nomes de espécies em tonalidade escura em cada filogenia representa a presença de cada espécie de hospedeiro e parasito na microbacia, enquanto os mais claros representam a ausência de cada espécie.....	128

Figura 19. Representação gráfica dos módulos gerados pelas associações hospedeiro-parasitas do sistema da Baía de Paranaguá, com informações de ausência e presença de interações. Os quadrados centrais representam as interações entre parasitos e seus hospedeiros dentro e fora de cada módulo. Os módulos estão representados pelos retângulos vermelhos. Os peixes hospedeiros estão amostrados à esquerda e os parasitos a baixo.....	129
Figura 20. Cladograma final obtido pelo PACT compilando as filogenias de <i>Aglaogyrodactylus</i> e <i>Phanerothecium</i> + <i>Onychogyrodactylus</i> e seus hospedeiros. O cladograma a esquerda, representa as associações histórica entre espécies de parasitos e seus hospedeiros. Os maiores valores de prevalência de associação para as microbacias da região Oeste e Norte da Baía de Paranaguá estão apresentados na extremidade dos ramos do cladograma a esquerda. O cladograma a direita apresenta as associações históricas registradas em cada área/microbacias (Oeste e Norte). Na extremidade dos ramos está indicado se a associação observada ocorre em uma ou nas duas áreas. Os nós resultantes de eventos de isolamentos (I) e expansão (E) estão apresentados de acordo com o protocolo de Lieberman's.....	132
Figura 21. Histograma indicando valores de prevalência de associação entre hospedeiros e espécies de Gyrodactylidae encontrados em cada microbacia estudada. Histogramas sem indicação de prevalência indicam a presença do hospedeiro e ausência do parasito. O eixo “y” indica os valores de prevalência e “x” todas as espécies de girodactilídeos encontradas no sistema da Baía de Paranaguá. Os retângulos vazios representam a ausência do hospedeiro na microbacia.....	135
Figura 22. Ilustração da história ancestral do sistema hospedeiro-parasito da Baía de Paranaguá visualizada na forma de redes de interação ecológica. Os “x” em cada rede representa a interação entre as espécies de Gyrodactylidae e seus hospedeiros. Os triângulos indicam período em que ocorreram eventos de isolamento nas comunidades como datado por Tschá (2016). As setas voltadas para acima indicam os dois momentos em que ocorram transgressões marinhas e a seta voltada para baixo indica o momento em que ocorreu uma regressão do nível do mar.....	137

LISTA DE TABELAS

Capítulo I.

Table 1. Geographic coordinates of each microbasin sampled in the present study, with information of rivers and municipality.....	34
Table 2. List of species of host fishes captured in the coast of Paraná with order and family information for each species. The “ <i>n</i> ” values indicate the number of all individuals collected for each host species in coast.....	37
Table 3. List of Gyrodactylidae species in the coast of Paraná, with group information that belongs each species. The “ <i>n</i> ” values indicate the number of all individuals collected for each gyrodactylids species in coast.....	38
Table 4. Genetic distances between paired oviparous Gyrodactylidae species, based on rDNA fragment <i>ITS</i> . The number of base by substitutions sites of sequences. Analyses were conducted using the model of Maximum Composite Likelihood (Tamura et al. 2004). All ambiguous positions were removed for each pair of sequences.....	56
Table 5. Genetic distances between paired oviparous Gyrodactylidae species, based on mtDNA <i>COII</i> . The number of base by substitutions sites of sequences. Analyses were conducted using the model of Maximum Composite Likelihood (Tamura et al. 2004). All ambiguous positions were removed for each pair of sequences.....	57
Table 6. Genetic distances between paired viviparous Gyrodactylidae species, based on rDNA fragment <i>ITS</i> . The number of base by substitutions sites of sequences. Analyses were conducted using the model of Maximum Composite Likelihood (Tamura et al. 2004). All ambiguous positions were removed for each pair of sequences.....	58
Table 7. Genetic distances between paired viviparous Gyrodactylidae species, based on mtDNA <i>COII</i> . The number of base by substitutions sites of sequences. Analyses were conducted using the model of Maximum Composite Likelihood (Tamura et al. 2004). All ambiguous positions were removed for each pair of sequences.....	58

Capítulo II.

Table 1. List of markers with its sequences and annealing temperatures (T) used for amplification of the hosts for each gene tested in this study.....	65
Table 2. Lists of host species ingroups and outgroup, with family information, voucher and identification in Genbank.....	66
Table 3. Lists of parasites species ingroup and outgroup, with family information, voucher and identification in Genbank.....	66

Capítulo III.

Tabela 1. Coordenadas geográficas de cada microbacia amostrada no presente estudo, com informações dos rios e municípios.....	96
Tabela 2. Lista dos marcadores com suas sequências e temperaturas de anelamento (T) utilizados na amplificação do DNA dos parasitos para cada gene testado no presente estudo.....	98
Tabela 3. Lista dos marcadores com suas sequências e temperaturas de anelamento (T) utilizados na amplificação do DNA dos hospedeiros para cada gene testado no presente estudo.....	98

Tabela 4. Identificação das espécies de parasito utilizadas como grupo externo na análise filogenética dos Gyrodactylidae e disponíveis no GenBank.....	99
Tabela 5. Identificação das espécies hospedeiras de Pimelodidae utilizadas como grupo externo na análise filogenética e disponíveis no GenBank.....	100
Tabela 6. Número de espécimes coletados de cada hospedeiro em cada rio/microbacia o presente estudo, com informações da subfamília a que pertencem.....	105
Tabela 7. Interação entre espécies de parasito e hospedeiro em cada microbacia da planície costeira do Paraná, com valores de abundância média (<i>Abd</i>) e prevalência (<i>Prev</i>).....	113
Tabela 8. Índice de especialização da rede (H_2'). Os valores de H_2' são os resultados normalizados de especialização do sistema hospedeiro-parasito de cada microbacia e de todas agrupadas.....	130

RESUMO GERAL

A fauna de peixes Neotropicais de água doce apresenta grande diversidade de espécies. Os processos associados a diversificação de organismos de água doce na América do Sul são muitos, incluindo eventos eustáticos derivados de grandes glaciações durante o Pleistoceno. O primeiro capítulo desse estudo teve como objetivo definir a composição das espécies de Gyrodactylidae presentes na planície Costeira do Paraná, combinando técnicas de identificação morfológicas e comparando com dois marcadores de código de barras (ITS e COII). Todas as espécies ovíparas identificadas morfológicamente foram confirmadas pelos marcadores de código de barras, incluindo três novas espécies sugeridas para *Aglaiogyrodactylus* e as cinco novas espécies propostas para *Phanerothecium*. Este estudo propôs quatro novas espécies para o clado vivíparo. No entanto a análise de código de barras indica duas potenciais novas espécies com base na morfologia para *Gyrodactylus* como uma única espécie. Para avaliar as associações entre sete espécies de *Aglaiogyrodactylus* e seus hospedeiros em um trecho do rio Marumbi, no segundo capítulo alguns dos preceitos do Paradigma de Estocolmo foram aplicadas em uma otimização filogenética apontando três espécies de loricarídeos como hospedeiros ancestrais de *Aglaiogyrodactylus*. No terceiro capítulo o cenário de estudo foi ampliado para quinze rios representando oito microbacias da Baía de Paranaguá. Nesse capítulo foi avaliada a composição de cada microbacia, aplicando dois pressupostos do Paradigma de Estocolmo: *Ecological fitting* e Teoria do Mosaico Geográfico de Coevolução. O objetivo principal foi testar através de previsões derivadas dos dois preceitos do Paradigma de Estocolmo através de observações empíricas obtidas de um modelo complexo de associações hospedeiro-parasito da Baía de Paranaguá. A região oferece um cenário paleoclimático ideal para avaliar as estruturas das comunidades de hospedeiro e seus parasitos. As análises desse capítulo indicaram diferenciação entre as comunidades de hospedeiros e parasitos da região. As microbacias do Oeste da Baía de Paranaguá, exibem espécies de parasitos ausentes em microbacias do Norte, e algumas espécies presentes no Norte não são encontradas no Oeste. Esses resultados suportam a hipótese da influência da alteração no nível do mar, causando conexão e isolamento de rios e bacias na região, ocasionando mistura e extinção de espécies de parasitos e seus hospedeiros. O isolamento e expansão na gama de hospedeiros foi observada na reconstrução histórica, enquanto a análise de reconstrução de redes ancestrais sugere que as espécies de parasitos e hospedeiros já estavam presentes nesse sistema antes das perturbações originadas pela alteração no nível do mar. As linhagens de parasitos encontradas atualmente, provavelmente sobreviveram, devido a capacidade de utilizar novos hospedeiros através do processo de *Ecological fitting*.

ABSTRACT

The Neotropical freshwater fish fauna presents a great diversity of species. The processes associated with diversification of freshwater organisms in South America are many, including derivatives of major glaciations during the Pleistocene eustatic events. The first chapter of this study aimed to define the composition of the Gyrodactylidae species present in Paraná Coastal plain, combining morphological identification and comparing with two barcode markers (ITS and COII). All oviparous species identified morphologically were confirmed by DNA barcode, including the three new species suggested for *Aglaiogyrodactylus* and five new species for *Phanerothecium*. This study proposed four new species for the viviparous clade. However, the barcode analysis indicates two potential new species based on morphology for *Gyrodactylus* as a single species. To evaluate the associations between seven species of *Aglaiogyrodactylus* and their hosts in a stretch of the Marumbi river, in the second chapter, some of the precepts of the Stockholm Paradigm were applied. Phylogenetic optimization of hosts points to three loricariids species as hosts ancestral clade of *Aglaiogyrodactylus*. In the third chapter the scenario was expanded to fifteen rivers representing eight microbasins of Paranaguá Bay. In this chapter we evaluated the composition of each microbasin, applying two assumptions of the Stockholm Paradigm: *Ecological fitting* and the Theory of the Geographic Mosaic in Coevolution. The main goal was to test predictions derived through the two Stockholm Paradigm precepts through empirical observations obtained from a complex model of host-parasite associations of Paranaguá Bay. The region offers an ideal scenario to evaluate paleoclimatic structures of host communities and their parasites. The analyzes in this chapter indicated differentiation between hosts and parasites communities in the region. The microbasins of the West Bay display parasites some species absent in North, and some species in the North are not found in the West. These results support the hypothesis of the influence of the sea level change, causing isolation and connection in rivers and basins in the region, causing mixing and extinction of parasites and their hosts. Isolation and expansion of the host range was observed in historical reconstruction, while the reconstruction of ancestral networks suggests that species of parasites and hosts were already present in the system before the disturbances caused by the sea level change. The parasite lineages currently found probably survived because the ability to use new hosts through the *Ecological fitting* process.

INTRODUÇÃO GERAL

Durante o último meio século, os paradigmas tradicionais têm levado a paradoxos sobre dispersão, sucesso e a evolução das associações ecológicas interespecíficas (Thompson, 2005). O paradoxo do parasitismo (Agosta et al., 2010) baseia-se na combinação de observações ecológicas e filogenéticas. De acordo com esse paradoxo, parasitos são especialistas ecológicos e ainda: (i) espécies especialistas e generalistas não ocorrem igualmente, espécies especialistas são predominantes no ambiente, enquanto generalistas são raros; (ii) muitas doenças emergentes ocorrem mais rapidamente do que o esperado devido a possibilidade de originar novidades evolutivas associadas com a capacidade de usar hospedeiros; e (iii) as comparações filogenéticas mostram altos níveis de trocas de hospedeiros na diversificação coevolutiva de associações interespecíficas (Agosta et al., 2010, Brooks et al., 2014).

O Paradigma de Estocolmo (Hoberg & Brooks, 2015) é uma proposta com uma base conceitual para o paradoxo do parasitismo estendendo-se de princípios Darwinianos fundamentais (Agosta et al., 2010; Brooks & Agosta, 2012). O paradigma engloba quatro preceitos ecológicos fundamentais e: (1) *Ecological Fitting* (Janzen, 1985) explica como trocas de hospedeiros podem ocorrer rapidamente e frequentemente, sem que seja necessária a evolução de um espectro de novidades evolutivas associadas a exploração de um novo recurso (representado pelo novo hospedeiro), essa capacidade ocorre em função da flexibilidade fenotípica e conservadorismo filogenético de caracteres das espécies. Como consequência desse conceito, especialistas podem estar envolvidos na expansão da sua gama de hospedeiros através de um processo dinâmico de *ecological fitting*. Esses organismos utilizam características pré-existent herdadas de ancestrais para sobreviverem dentro de um espaço denominado *Sloppy fitness space* (Agosta & Klemens, 2008, 2009; Agosta et al., 2010). (2) A *hipótese de Oscilação*, descreve eventos de alternância evolutiva entre generalistas e novos especialistas (Janz & Nylin, 2008; Nylin et al., 2014). Com o tempo, novas combinações entre espécies que interagem surgem através de processos definidos dentro da (3) Teoria do *Mosaico Geográfico de Coevolução* (Thompson, 2005). Essa teoria sugere que as espécies interagem e existem em um *fitness space* o qual é representado por um conjunto de áreas

geográficas potenciais, ecossistemas e hospedeiros inacessíveis historicamente - por circunstâncias de tempo, espaço e origem. Muitas espécies, tem sua origem, existem e persistem em um cenário de mudança acelerada, demonstrando a equivalência dos processos de composição de comunidades, incluindo colonização geográfica e de hospedeiros através de escalas espaciais e ao longo do tempo evolutivo e ecológico (Hoberg, 2010; Hoberg & Brooks, 2008, 2010). (4) Pulsos de Táxons (*Taxon Pulse*) (Erwin, 1985; Halas et al., 2005), mudança climática e perturbações ecológicas em grande escala, levam a extensas misturas bióticas (e mosaicos). Esses pulsos de táxon precedem de episódios de rápida troca de hospedeiros, incluindo surtos de doenças infecciosas emergentes (Agosta et al., 2010; Brooks & Hoberg, 2007, 2013; Hoberg & Brooks, 2008, 2013).

Introgresões marinhas que ocorreram durante o Pleistoceno e Holoceno (período Quaternário) desempenharam um papel importante na formação da costa litorânea da América do Sul (Suguio et al., 1985). A ictiofauna Neotropical de água doce possui mais de quatro mil espécies conhecidas, e sua grande diversidade é resultado da influência de fatores ecológicos e históricos ao longo de milhões de anos (Reis et al., 2003). Os processos associados a diversificação do grupo são inúmeros, entre eles, processos tectônicos, bem como as mudanças cíclicas que ocasionaram as variações no nível do mar (Weitzman et al., 1988; Ribeiro, 2006).

Alterações do nível do mar promoveram ciclos de isolamento e união de bacias costeiras (Martin, 2003) e possivelmente influenciaram a diversidade de peixes da região (April et al., 2012). Segundo Ribeiro (2006) mecanismos tectônicos exerceram influências na ictiofauna local ocasionando conexões entre as bacias dos planaltos de altitude e rios da planície costeira brasileira. De acordo com Lundberg et al. (1998), os sistemas fluviais da América do Sul passaram por mudanças significativas como resultado da formação da Cordilheira dos Andes durante o final do Cretáceo e Cenozóico, que promoveu eventos de variância, divergência e diversificação biótica na da região. Os autores também indicam que durante o final do Mioceno (11,8 - 10 Mya), uma transgressão marinha no estuário do Paraná (Mar del Plata), formou um extenso corpo de água salgada.

A Bacia Litorânea do Paraná, local do presente estudo é constituída por aspectos geológicos distintos, é uma planície de fisiografia ímpar, com sub-regiões limitadas por baías, pela Serra do Mar e suas ramificações, e pelo Oceano Atlântico

(Morrone, 2001). A Serra do Mar é um conjunto de escarpas festonadas (grande relevo de formato agudo) com cerca de 1.000 km de extensão, em que termina o Planalto Atlântico no trecho voltado para a Bacia de Santos. Se estende do Rio de Janeiro ao norte de Santa Catarina. No Paraná configura uma cadeia de montanhas com cimos elevados até a 1.800 m de altitude (Almeida & Carneiro, 1998). Segundo Maack (1968) a Serra do Mar não representa no Paraná apenas o degrau entre o litoral e o primeiro planalto do interior, mas constitui também uma serra marginal típica que se eleva de 500 a 1.000 m sobre o nível médio do planalto. Esse conjunto, formado pelo oceano, bacias hidrográficas, baías e montanhas representam feições geográficas com alto potencial para barreiras biogeográficas de espécies com menor vagilidade, mesmo considerando a pequena escala geográfica da área.

Os períodos de conexão (baixa do nível do mar) possibilitaram a expansão da fauna para estuários e bacias adjacentes, enquanto períodos de isolamento (alta do nível do mar) promovem diferenciação genética por vicariância. Esse padrão foi detectado por Boeger e Kritsky, (2003) e Boeger et al. (2015) em peixes Sciaenidae das Bacias Amazônica e do Paraná na América do Sul. De acordo com esses autores algumas espécies da família colonizaram o ambiente de água doce durante períodos de transgressão. É possível prever que a ocorrência de uma sequência de ciclos pode acarretar em áreas reticuladas de distribuição de linhagens e espécies. Tal sequência de eventos tem a capacidade de criar um processo cíclico de diversificação (April et al. 2013), o que explicaria a grande diversidade faunística encontrada na costa brasileira. Estudos preliminares demonstram que as microbacias da planície costeira paranaense apresentam identidades taxonômicas e genéticas distintas (Bueno-Silva et al., 2011). Bueno-Silva (2011) sugere que retrações e expansões populacionais em *Gyrodactylus* spp. (Gyrodactylidae) e seu hospedeiro, *Scleromystax* spp. (Callichthyidae), estão associados a períodos glaciais e interglaciais que ocorreram entre o final do Pleistoceno e meados do Holoceno. A história demográfica dos parasitos e dos seus hospedeiros indicam um declínio populacional há cerca de 150.000 anos, coincidente com o início do período glacial. Episódios de mudanças climáticas e ambientais, em conjunto com mecanismos ecológicos e troca de hospedeiro, muitas vezes são determinantes para diversificação do parasito (Hoberg & Klassen, 2002, Hoberg & Brooks, 2013; Hoberg et al., 2012).

Tschá (2016) sugere que as populações de peixes de água doce das microbacias no entorno da Baía de Paranaguá sofreram um processo recente de gargalo genético associado à fragmentação decorrente da última elevação do nível do mar. Esse processo é visível no sinal genético de diversas populações de peixes de água doce dessas bacias (Tschá, 2016) mas certamente influenciou diretamente a estrutura e composição da ictiofauna das diferentes microbacias na região. Assim como para linhagens genéticas de uma espécie (i.e. haplótipos), a composição de espécies de uma ictiocenose representa o resultado de um processo semelhante a uma “loteria ecológica”, no qual a colonização e a extinção de espécies de peixes ao acaso nos diferentes fragmentos determina o perfil da comunidade de cada bacia hidrográfica.

Ciclos de conexão e reconexão hipotetizados para as bacias costeiras brasileiras é condizente com a Hipótese de *Taxon Pulse* como proposto por Tschá, (2016) para espécies de peixes da Baía de Paranaguá. O cenário de diversificação proposto para o litoral do Paraná torna-se ainda mais complexo quando consideramos associações ecológicas, como o parasitismo. Ao estudar peixes ósseos de água doce e seus parasitos, é possível testar alguns padrões esperados em diversos níveis de complexidade biológica, assim como, modelos de diversificação que podem ser explicados pelo Paradigma de Estocolmo. Estudos recentes sugerem que parasitos podem trocar de hospedeiros (*host switching*) mais facilmente do que esperado no passado graças ao processo de *ecological fitting* (vide Araujo et al., 2015; Hoberg & Brooks, 2008; Agosta et al., 2010). Isso implica que, mesmo na ausência de seu hospedeiro “original” uma linhagem de parasito possa prevalecer se for capaz de utilizar os recursos representados por outras espécies hospedeira (Hoberg & Brooks, 2010).

Os parasitos alvo desse estudo são as espécies de Gyrodactylidae Van Beneden et Hess, 1863 (Platyhelminthes, Monogeneoidea). Gyrodactylidae é composta por espécies vivíparas e ovíparas. O número de espécies do clado vivíparo (aproximadamente 500 espécies) (Bakke et al., 2002) é significativamente maior do que o de seu grupo-irmão ovíparo, com apenas 23 espécies registradas até o momento (Kritsky et al., 2007). Dentre as espécies vivíparas *Gyrodactylus* é o gênero mais significativo com mais de 400 espécies descritas (Bakke et al., 2007; Bueno-Silva & Boeger, 2014). Esses parasitos apresentam alta especificidade ao hospedeiro,

muitas vezes restritos apenas a uma espécie hospedeira (Rohde, 1979; Bakke et al., 1991). O rápido tempo de geração dos parasitos, combinado com a alta riqueza de espécies, distribuição geográfica e a capacidade de expandir seu espectro de hospedeiros provavelmente permite a detecção de eventos de flutuações populacionais de forma mais eficaz do que seus hospedeiros.

As espécies vivíparas são as únicas dentre os Monogenoidea a apresentar reprodução por hiperviviparidade, onde um verme “mãe” pode carregar em seu útero gerações subsequentes de vermes “filhos” (Cable & Harris, 2002). Essas espécies possuem uma ampla distribuição em ambientes marinhos e de água doce, parasitando diversos grupos de hospedeiros: Cephalopoda, Amphibia e diversos grupos de peixes ósseos (Bakke et al., 2002). A maioria das espécies de *Gyrodactylus* ocorre apenas em uma espécie de hospedeiro, porém algumas têm a capacidade de parasitar e realizar troca entre hospedeiros simpátricos, mesmo durante a fase adulta (Bakke et al., 2002, 2007). De acordo com Boeger et al. (2003), os Gyrodactylidae vivíparos apresentam alta taxa de diversificação devido à sua capacidade de realizar trocas de hospedeiro de maneira contínua ao longo da vida adulta. Sua distribuição mundial parece, estar associada com mecanismos não vicariantes, especialmente dispersão, utilizando espécies hospedeiras marinhas como “pontes” para ultrapassar barreiras biogeográficas (Boeger et al., 2003). Essa capacidade pode ser explicada pelo *stepping-stones*, (Braga et al., 2014; Araujo et al., 2015), esse mecanismo permite que as espécies de parasito alcancem hospedeiros filogeneticamente distante por colonização de hospedeiros semelhantes (filogeneticamente próximos). Assim, acredita-se que a ampla distribuição dos parasitos na filogenia dos hospedeiros tenham passado por esse processo, colonizando recursos próximos entre si e distanciando-se do seu hospedeiro ancestral.

As espécies ovíparas, aparentemente, estão restritas à região Neotropical e ocorrem principalmente em peixes Loricariidae (Bakke et al., 2002) e em algumas espécies de Pimelodidae (Kritsky et al., 2007). Essas espécies produzem ovo com uma gotícula adesiva perto da ponta do filamento polar proximal (Boeger & Kritsky, 2001). A gotícula tem como função fixar individualmente os ovos, ou um agrupamento destes, em superfícies duras de seus hospedeiros, onde ocorre o desenvolvimento embrionário (Kearn, 1986, 1998). Nesse grupo de parasitos, a larva eclodida não contém cílios e, portanto, é incapaz de procurar ativamente um novo hospedeiro. No

entanto, essa característica provavelmente reduziu a capacidade de dispersão das espécies ovíparas para novos hospedeiros, limitando o espectro de hospedeiros alvos para aqueles com superfícies duras (Boeger et al., 2003).

O processo de diversificação proposto para as espécies parasitas deve ser análogo ao de seus hospedeiros, com uma exceção. A habilidade de utilizar diversos recursos/hospedeiros por *ecological fitting*, deve permitir que linhagens prevaleçam, mesmo na ausência ou redução no tamanho populacional das espécies hospedeiras “originais” ou “preferenciais”. Esse estudo tem como objetivo geral avaliar a influência de eventos de variação no nível do mar sobre a diversidade e associações em um sistema hospedeiro-parasito complexo da Baía de Paranaguá utilizando alguns dos preceitos do Paradigma de Estocolmo.

Esses argumentos lógicos, corolários do cenário observado para as linhagens genéticas dos peixes da região (vide Tschá, 2016) e do Paradigma de Estocolmo, permitem traçar uma série de previsões sobre os sistemas hospedeiros-parasitos, passíveis de teste nesse estudo:

1. Parasitos podem estar ausentes em uma ou mais bacia(s) mesmo se seus hospedeiros estiverem presentes. *Essa previsão sugere que a redução histórica no tamanho populacional dos parasitos ou de seus hospedeiros (mesmo que esses últimos tenham recuperado o tamanho populacional subsequente ao gargalo genético) possa ter resultado na extinção local da espécie/linhagem do parasito.*
2. Que as espécies de parasitos não necessariamente estarão ausentes mesmo nas bacias nas quais hospedeiros dessa espécie não estejam presentes. *Essa previsão sugere que mesmo com a perda da(s) espécie(s) hospedeira(s) em uma microbacia, o parasito prevalece utilizando outros recursos, provavelmente por Ecological Fitting.*
3. Que uma mesma espécie de parasito possa apresentar um espectro de *fit* distinto no cenário acima ou mesmo na presença das mesmas espécies de hospedeiros em microbacias hoje consideradas isoladas. *Nessa previsão, explora-se a hipótese do Mosaico Geográfico de Coevolução, o qual sugere que o grau de compatibilidade do sistema hospedeiros-parasito pode variar espacialmente.*
4. Que a proximidade filogenética de espécies hospedeiras influencie o espectro de hospedeiros utilizados por uma espécie de parasito. *Nessa*

previsão, hospedeiros filogeneticamente próximos devem representar recursos semelhantes por conservatismo evolutivo e, portanto, passíveis de serem utilizados por uma mesma espécie/linhagem de parasito. A utilização de recursos distantes filogeneticamente deve ser menos frequente e representar convergência de recursos para a espécie parasita.

O presente estudo foi dividido em três capítulos integrados e em níveis de complexidade crescente. O primeiro capítulo, intitulado “**Diversity of Gyrodactylidae in fish hosts of the Paraná Coastal Plain based on morphology and DNA barcoding**” teve como objetivo definir a composição específica das espécies de Gyrodactylidae utilizadas como modelo combinando critérios morfológicos e moleculares (*Genetic barcode*). Nesse capítulo, foram utilizados dois marcadores moleculares de código de barras, região do espaçador transcrito interno ITS e gene mitocondrial COII para confirmar a diversidade taxonômica das espécies de Gyrodactylidae na Planície costeira do Paraná. Foram identificadas morfológicamente 16 espécies ovíparas de Gyrodactylidae, três são sugeridas como novas espécies para *Aglaiogyrodactylus* e cinco novas espécies para *Phanerothecium*. Para o clado vivíparo, foi sugerido uma nova espécie para *Anacanthocotyle* e três novas espécies para *Gyrodactylus*, totalizando de 6 espécies vivíparas de Gyrodactylidae. Os resultados de ambos marcadores para as espécies ovíparas foram condizentes com as identificações realizadas com características morfológicas. Ambos marcadores rejeitaram a identificação morfológica de duas novas espécies propostas para *Gyrodactylus*, indicando que esses espécimes seriam uma mesma espécie.

No Capítulo II, intitulado “**The Stockholm Paradigm: Phylogeny and Ecology Illuminate the Evolution of *Aglaiogyrodactylus* (Gyrodactylidae, Monogenoidea)**” foram aplicados os preceitos do Paradigma de Estocolmo para interpretar a distribuição de sete espécies de *Aglaiogyrodactylus* em seus hospedeiros, coletados em um único trecho do rio Marumbi. As espécies de *Aglaiogyrodactylus* apresentaram dois padrões de espectro de hospedeiros. A otimização filogenética sugere três espécies hospedeiras ancestrais para esse grupo de parasito. Uma espécie de *Aglaiogyrodactylus* além de colonizar as três espécies hospedeiras ancestrais, apresentou capacidade de colonizar outras duas espécies hospedeiras, expandindo sua gama de hospedeiros, enquanto outras perderam a capacidade de colonizar as

espécies ancestrais e consequentemente colonizaram novos hospedeiros filogeneticamente próximos a um dos ancestrais. Esses resultados confirmaram as expectativas do Paradigma de Estocolmo.

Finalmente, o Capítulo III, **“Testando conceitos subordinados do Paradigma de Estocolmo: associações hospedeiros-parasitos na Baía de Paranaguá”** testa as previsões decorrentes de dois componentes do Paradigma de Estocolmo, utilizando como modelo os sistemas hospedeiro-parasitos de água doce de microbacias da Planície Costeira do Paraná, no entorno da Baía de Paranaguá. Através da análise dos dados da diversidade e redes ecológicas das espécies de Gyrodactylidae em cada espécie hospedeira podemos observar diferentes composições da fauna desses parasitos entre o conjunto de microbacias do Oeste e do Norte da Baía. Espécies ovíparas de Gyrodactylidae apresentaram capacidade de sobreviver mesmo em condições subótimas em novos hospedeiros filogeneticamente próximos ou não na ausência de seu hospedeiro original, essa capacidade está inteiramente ligada ao Ecological fitting de cada espécie. A análise do PACT e de ancestralidade mostram eventos de isolamento na gama de hospedeiros e expansão condizentes com eventos de isolamento e conexões de bacias durante as alterações do nível do mar durante o Pleistoceno. A reconstrução de ancestralidade indica que todas as espécies de hospedeiro e parasitos encontradas no presente estudo provavelmente encontravam-se presentes no sistema antes dos eventos de alterações do nível do mar. O padrão de variação das prevalências entre microbacias do Oeste e Norte da Baía de uma espécie de parasito em um mesmo hospedeiros está de acordo com a teoria do mosaico geográfico de coevolução.

REFERENCIAS

Agosta, S.J.; Klemens, J.A., 2008. Ecological fitting by phenotypically flexible genotypes: implications for species associations, community assembly and evolution. *Ecology Letters*, 11, 1123-1134.

- Agosta, S.J.; Klemens, J.A., 2009. Resource specialization in a phytophagous insect: no evidence for genetically based performance tradeoffs across hosts in the field or laboratory. *Journal of Evolutionary Biology*, 22, 907-912.
- Agosta, S.J., Jans, N.; Brooks, D.R., 2010. How generalists can be specialists: resolving the “parasite paradox” and implications for emerging disease. *Zoologia*, 27, 151-162.
- Almeida, F.F.M.; Carneiro, C.D.R., 1998. Origem da Serra do Mar. *Revista Brasileira de Geociência*, 28, 2, 135-150.
- April, J.; Hanner, R.H.; Dion-Côté, A.M.; Bernatchez, L., 2013. Glacial cycles as an allopatric speciation pump in North Eastern American freshwater fishes. *Molecular Ecology*, 22, 409-422.
- Araujo, S.B.; Braga, M.P.; Brooks, D.R.; Agosta, S.J.; Hoberg, E.P.; von Hartenthal, F.W.; Boeger, W.A., 2015. Understanding Host-Switching by Ecological Fitting. *PloS one*, 10, 10, 1-17.
- Bakke, T.A.; Jansen, P.A.; Hansen, L.P., 1991. Experimental transmission of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Platyhelminthes, Monogenea) from the Atlantic salmon (*Salmo salar*) to the European eel (*Anguilla anguilla*). *Canadian Journal of Zoology*, 69, 733-737.
- Bakke, T.A.; Harris, P.D.; Cable, J., 2002. Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans. *International Journal for Parasitology*, 32, 281-308.
- Bakke, T.A.; Cable, J.; Harris, P.D., 2007. The biology of gyrodactylid monogeneans: the “Russian Doll-killers”. *Advanced Parasitology*, 64, 161-376.
- Boeger, W.A.; Kritsky, D.C., 2001. Phylogenetic relationships of the Monogenoidea. In D. T. J. Littlewood & R. A. Bray (Eds) *Interrelationships of the Platyhelminthes*. London: Taylor & Francis., 92-102.
- Boeger, W.A.; Kritsky, D.C., 2003. Parasites, fossils and geologic history: historical biogeography of the South American freshwater croakers, Plagioscion spp. (Teleostei, Sciaenidae). *Zoologica Scripta*, 32, 1, 3-11.
- Boeger, W.A.; Kritsky, D.C.; Pie, M.R., 2003. The context of diversification of the viviparous Gyrodactylidae. *Zoologica Scripta*, 32, 5, 437-448.
- Boeger, W.A.; Marteleto, F.M.; Zagonel, L.; Braga, M.P., 2015. Tracking the history of an invasion: the freshwater croakers (Teleostei: Sciaenidae) in South America. *Zoologica Scripta*, 44, 3, 250-262.

- Braga, M.P.; Razzolini, E.; Boeger, W.A., 2014. Drivers of parasite sharing among Neotropical freshwater fishes. *Journal of Animal Ecology*, 84, 2, 487-497.
- Brooks, D.R.; McLennan, D.A., 2002. The nature of diversity: an evolutionary voyage of discovery. *University of Chicago Press*, Chicago. 668.
- Brooks, D.R.; Hoberg, E.P., 2007. How will global climate change affect parasite-host assemblages? *Trends in Parasitology*, 23, 571-574.
- Brooks, D.R.; Agosta, S.J., 2012. Children of time: The extended synthesis and major metaphors of evolution. *Zoologia*, 29, 497-514.
- Brooks, D.R.; Hoberg, E.P., 2013. The emerging infectious disease crisis and pathogen pollution: a question of ecology and evolution. In *The balance of nature and human impact* (ed. Rohde K.), Cambridge, UK: Cambridge University Press, 215-229.
- Bueno-Silva, M.; Boeger, W.A.; Pie, M.R., 2011. Choice matters: incipient speciation in *Gyrodactylus corydori* (Monogeneoidea: Gyrodactylidae). *International Journal for Parasitology*, 41, 657-667.
- Bueno-Silva, M., 2011. Cofilogeografia: estruturação geográfica, demografia histórica e associação entre espécies de *Gyrodactylus* (monogeneoidea: gyrodactylidae) e hospedeiros *Scleromystax* (siluriformes: callichthyidae). 169 f. Tese (Doutorado em Zoologia) – *Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba*.
- Bueno-Silva, M.; Boeger, W.A., 2014. Neotropical Monogeneoidea. 58. Three new species of *Gyrodactylus* (Gyrodactylidae) from *Scleromystax* spp. (Callichthyidae) and the proposal of COII gene as an additional fragmente for barcoding gyrodactylids. *Folia Parasitologica*, 61, 3, 213-222.
- Cable, J.; Harris, P.D., 2002. Gyrodactylid developmental biology: historical review, current status and future trends. *International Journal for Parasitology*, 32, 255-280.
- Erwin, T.L., 1985. The taxon pulse: a general pattern of lineage radiation and extinction among carabid beetles. *Taxonomy, phylogeny and zoogeography of beetles and ants* (ed. By G. Ball), 437-472.
- Halas, D.; Zamparo, D.; Brooks, D.R., 2005. A protocol for studying biotic diversification by taxon pulses. *Journal of Biogeography*, 32, 249-260.
- Hoberg, E.P.; Klassen, G.J., 2002. Revealing the faunal tapestry: co-evolution and historical biogeography of hosts and parasites in marine systems. *Parasitology*, 124, S3-S22.

- Hoberg, E.P.; Brooks, D.R., 2008. A macroevolutionary mosaic: episodic host-switching, geographical colonization and diversification in complex host-parasite systems. *Journal of Biogeography*, 35, 1533-1550.
- Hoberg, E.P., 2010. Invasive processes, mosaics and the structure of helminth parasite faunas. *Revue scientifique et technique. International Office of Epizootics*, 29, 255-272.
- Hoberg, E.P.; Brooks, D.R., 2010. Beyond vicariance: integrating taxon pulses, ecological fitting and oscillation in historical biogeography and evolution. In *The geography of host-parasite interactions* (eds Morand S., Krasnov B.), Oxford, UK: Oxford University Press, 7-20.
- Hoberg, E.P.; Galbreath, K.E.; Cook, J.A.; Kutz, S.J.; Polley, L., 2012. Northern host-parasite assemblages: history and biogeography on the borderlands of episodic climate and environmental transition. *In Advances in parasitology*, 79, 1-97.
- Hoberg, E.P.; Brooks, D.R., 2013. 14 Episodic processes, invasion and faunal mosaics in evolutionary and ecological time. *The balance of nature and human impact*, 199.
- Hoberg, E.P.; Brooks, D.R., 2015. Evolution in action: climate change, biodiversity dynamics and emerging infectious disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 370(1665), 20130553.
- Janz, N.; Nylin, S., 2008. The oscillation hypothesis of host plant-range and speciation. p. 203-215. *In*: K.J. Tilmon (Ed). *Specialization, speciation, and radiation: the evolutionary biology of herbivorous insects*. Berkley, University of California Press.
- Janzen, D.H., 1985. On ecological fitting. *Oikos*, 45, 308-310.
- Kearn, G.C., 1986. The eggs of monogeneans. *Advances in Parasitology*, 25, 175-273.
- Kearn, G.C., 1998. *Parasitism and the Platyhelminths*. London: Chapman & Hall.
- Kritsky, D.C.; Vianna, R.T.; Boeger, A., 2007. Neotropical Monogenoidea. 50. Oviparous gyrodactylids from loricariid and pimelodid catfishes in Brazil, with the proposal of *Phanerothecioides* n. g., *Onychogyrodactylus* n. g. and *Aglaigyrodactylus* n. g. (Polyonchoinea: Gyrodactylidea). *Systematic Parasitology*, 66, 1-34.
- Lundberg, J.G.; Marshall, L.G.; Guerrero, J.; Horton, B.; Malabarba, M.C.S.L.; Wesseningh, F., 1998. The stage for neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. In L. R. Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S.

- Lucena & C. A. S. Lucena(Eds) Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre, Brasil: EDIPUCRS, 13-48.
- Maack, R., 1968. Geografia Física do Estado do Paraná. Curitiba: Banco de Desenvolvimento do Estado do Paraná, Universidade Federal do Paraná e Instituto de Geologia e Pesquisas Tecnológicas, 350.
- Martin, L., 2003. Holocene sea-level history along eastern-southeastern Brazil. *Anuário do Instituto de Geociências*, 26, 13-24.
- Morrone, J.J., 2001. Biogeografia de América Latina y el Caribe. M&T-Manuales & Tesis SEA, Zaragoza, 3, 148.
- Nylin, S.; Slove J.; Janz, N., 2014. Host plant utilization, host range oscillations and diversification in nymphalid butterflies: a phylogenetic investigation. *Evolution* 68, 105-124.
- Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris, C.J. 2003. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs.
- Ribeiro, A.C., 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology* 4, 225-246.
- Rohde, K., 1979. A critical evaluation of intrinsic and extrinsic factors responsible for niche restriction in parasites. *The American Naturalist*, 114, 648-671.
- Suguio, K.; Martin, L.; Bittencourt, A.C.S.P.; Dominguez, J.M.L.; Flexor, J.M.; Azevedo, A.E.G., 1985. Flutuações do nível relativo do mar durante o Quaternário Superior ao longo do litoral brasileiro e suas implicações na sedimentação costeira. *Revista Brasileira de Geociências*, 15, 273-286.
- Thompson, J.N., 1994. *The coevolutionary process*. Chicago, University of Chicago Press.
- Thompson, J.N., 2005. The geographic mosaic of coevolution. Chicago, University of Chicago Press.
- Tschá, M.K., 2016. Taxon Pulse: Um modelo para a diversificação genética de peixes em bacias hidrográficas costeiras. 110 p. Tese (Doutorado em Zoologia) – Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Weitzman, S.H., Menezes, N.A.; Weitzman, M.J., 1988. Phylogenetic biogeography of the glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. In

Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns (Vanzolini, P. E. & Heyer, W. R., eds). Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências. 379-427.

CAPÍTULO I

Diversity of Gyrodactylidae in fish hosts of the Paraná Coastal Plain based on morphology and DNA barcoding

Abstract: Recent studies indicate that the watersheds of the Paraná Coastal Plains presents a taxonomic and genetic distinctiveness. However the biogeography of fish and associated organisms, such as parasites, is not well known. Parasites targeted in this study are the species of Gyrodactylidae Van Beneden et Hess, 1863. The family is composed of oviparous and viviparous species. The morphological identification of Gyrodactylidae is essentially based on the comparison of haptor sclerotized structures. These structures may present many variations in different conditions and this can cause confusion in the taxonomy of the species. The use of barcode markers can minimize these problems in the taxonomy and phylogeny of Gyrodactylidae. Therefore, the present study aims to define the diversity of Gyrodactylidae of the coastal plain of Paraná, complementing the identification based on morphological characteristics of gyrodactylids with two markers of barcode, rDNA (*ITS*) and gene mtDNA (*COII*). The samples were collected in the rivers of the main microbasins the Paraná coast. Sixteen oviparous species of Gyrodactylidae were identified, of which 8 are considered new: three were suggested as new species of *Aglaiogyrodactylus* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007 and five new species of *Phanerothecium* Kritsky et Thatcher, 1977. Among the viviparous Gyrodactylidae, six species were identified, one new species for *Anacanthocotyle* Krytsky et Fritts, 1970 and three new species to *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832. The barcode analyses performed with the two aforementioned markers were able to separate the studied species, however, the *COII* gene showed greater efficiency in separating species. Both barcode markers rejected the identity of two new species proposed for *Gyrodactylus*, indicating that these specimens represent a single species. The combined use of morphological and molecular methodologies is ideal for determining species of Gyrodactylidae. The use of barcode markers is desirable to reduce erroneous identifications, something that occurs frequently in this group.

Keywords: Gyrodactylidae, barcoding, internal transcribed spacer, mitochondrial *COII* gene

(*) Capítulo formatado de acordo com as normas de publicação da revista *Folia Parasitológica*.

INTRODUCTION

The Neotropics has the most diversified freshwater fish fauna of the world, with more than 4,000 described species of the 13,000 in the world (Reis et al. 2003). According to Schaefer (1998), the actual number of Neotropical species can reach 8,000. The South American continent is home to most of this diversity, in the Amazon and Paraná basins. The Amazon has between 1,500 and 5,000 species of fish distributed in an area of about 7,000,000 km² (Santos and Ferreira, 1999); while approximately 600 species are recorded (Bonetto 1986) in the Paraná Basin, with an area of about 2,600,00 km² (or 2,985 if we include the River Uruguay) (Latrubesse et al. 2005). The Coastal Plain of Paraná consists of distinct geological forms and is characterized by a unique physiography throughout the whole plain, with sub-regions limited by Serra do Mar and its ramifications, bays and the Atlantic Ocean. The geological history of the Plain, in combination with climate changes of the past also appear to have influenced the formation of aquatic communities. However, the biogeography of fish and associated organisms, such as parasites, is not well known. In fact, preliminary studies show that the microbasins of the Paraná coastal plains present taxonomic identities distinct genetic (Bueno-Silva et al. 2011).

The parasites targeted in this study are the species of Gyrodactylidae (Platyhelminthes, Monogeneoidea). The family is composed of oviparous and viviparous species, and presents generation around 50-100 times faster than that of their hosts. Gyrodactylidae Van Beneden et Hess, 1863 is a taxon of great importance among the Monogeneoidea, widely distributed throughout the world and found in freshwater and marine fishes, terrestrial vertebrates and invertebrates. The gyrodactylids are the only ones to present reproduction by hyperviviparity, an innovation-key for this group (Brooks and McLennan 1993), in which a pregnant worm carries subsequent generations of worms already present in its uterus (Cable and Harris 2002). The origin of Gyrodactylidae is apparently recent, approximately 100 million years, since the origin of their ancestral oviparous species seems to be related to the dispersion of a marine host to Loricariidae, a family of Siluriformes restricted to South America (Boeger and Kritsky 2001). Consequently, the diversification of viviparous species seems to be linked to non-vicariant mechanisms, especially dispersion, using marine host species as bridges to overcome biogeographical barriers (Boeger et al. 2003). According to Bueno-Silva et al. (2011), the viviparity associated ability to perform multiple

transmissions, even as adults, increases the likelihood of sympatric speciation and speciation by peripheral isolation followed by host switch (Boeger et al. 2005). The oviparous species are restricted to the Neotropics and occur only in Loricariidae fish, while the viviparous species have a wide distribution in marine and freshwater habitats, parasitizing different host groups: Cephalopoda, Amphibia and bony fishes (Bakke et al. 2002). The number of viviparous clade species (approximately 500 species) (LeBlanc et al. 2006, Malmberg et al. 2007, Kuusela et al. 2008, Cone et al. 2010; García-Vásquez et al. 2011, Paladini et al. 2011) is significantly higher than that of its oviparous sister group, with only 23 species recorded until the moment (Boeger et al. 1994, Kritsky et al. 2007). In part, this difference in number of species between Gyrodactylidae groups may be related to the low number of specialized taxonomists in South America, where oviparous species are found.

The morphological identification of Gyrodactylidae is essentially based on the comparison of the sclerotized haptor structures, such as anchors and hooks. However, the structures of male sclerotized copulatory organs of some oviparous species contribute a lot to the taxonomy of the group. The use of morphometric analyses of these structures makes it possible to differentiate cryptic species and detect parasite species lineages (Shinn et al. 2004, Bueno-Silva 2007, Vignon and Sasal 2010). However, the sclerotized structures of the haptor may have many variations in shape and size when in different biotic and abiotic conditions (Malmberg 1970, Harris 1998, Huyse and Volckaert 2002, Dávidová et al. 2005), and this can cause confusion in taxonomic determination. Thus, in an attempt to minimize these problems, DNA molecular markers have been used in studies of taxonomy and phylogeny of Gyrodactylidae (Harris 1998, Cunningham 1997, Matejusová et al. 2001, Zietara et al. 2002, Huyse and Malmberg 2004, Kuusela et al. 2008, Hahn et al. 2011).

Many studies with monogeneans used portions of the rDNA, as the spacer regions *ITS-1* and *ITS-2* and mtDNA *COI*, to differentiate morphologically recognized species and also in identifying cryptic species (Cunningham 1997, Matějusková et al. 2001, Meinilä et al. 2002, Zietara and Lumme 2002, Pouyaud et al. 2006, Vanhove et al. 2013). Although the use of nuclear markers (e.g. *ITS*) has contributed much in the differentiation of *Gyrodactylus* spp., mitochondrial DNA markers, such as cytochrome oxidase subunit I and II have shown greater efficiency in taxonomic identification of these lineages (Meinilä et al. 2002, 2004, Hansen et al. 2007, Vanhove et al. 2013,

Bueno-Silva and Boeger 2014). According to Hansen et al. (2007) the internal transcribed spacer region (*ITS-1* and *ITS-2*), was not effective in differentiating the species of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957, from the non-pathogenic *Gyrodactylus thymalli* Žitňan, 1960. When testing the rDNA spacers (*ITS-1* and *ITS-2*), intergenic spacer (*IGS*) markers and mtDNA *COI* gene, the authors found that the first two, which are often used in DNA taxonomy, show no differences between the species. The best resolution was observed with mitochondrial haplotypes based on *COI*. Thus, the present study aims to define the diversity of Gyrodactylidae of the coastal plain of Paraná, combining the identification based on morphological characteristics of oviparous and viviparous gyrodactylids, with two barcode markers used for this group of parasite, rDNA *ITS* and gene mtDNA *COII* developed by Bueno-Silva and Boeger (2014).

MATERIAL AND METHODS

Collection of biological material

The samples were collected in the rivers of the main microbasins of the coast of Paraná in April, May, July, August, September and October 2012 and January, May, October and November 2013. Samples were collected in the Sagrado and Meio Rivers (Sagrado Microbasin), Marumbi, Pinto and Passa Sete Rivers (Nhundiaquara Microbasin), Nunes and Cacatu Rivers (Cacatu Microbasin), Morato River (Guaraqueçaba Microbasin), Capivari and Tagaçaba Rivers (Tagaçaba Microbasin), Pederneiras and Bananal Rivers (Serra Negra Microbasin), Brejatuba River (Guaraguaçu Microbasin) and Saci and Mergulhão Rivers (Cachoeira Microbasin) (Figure 1, Table 1).

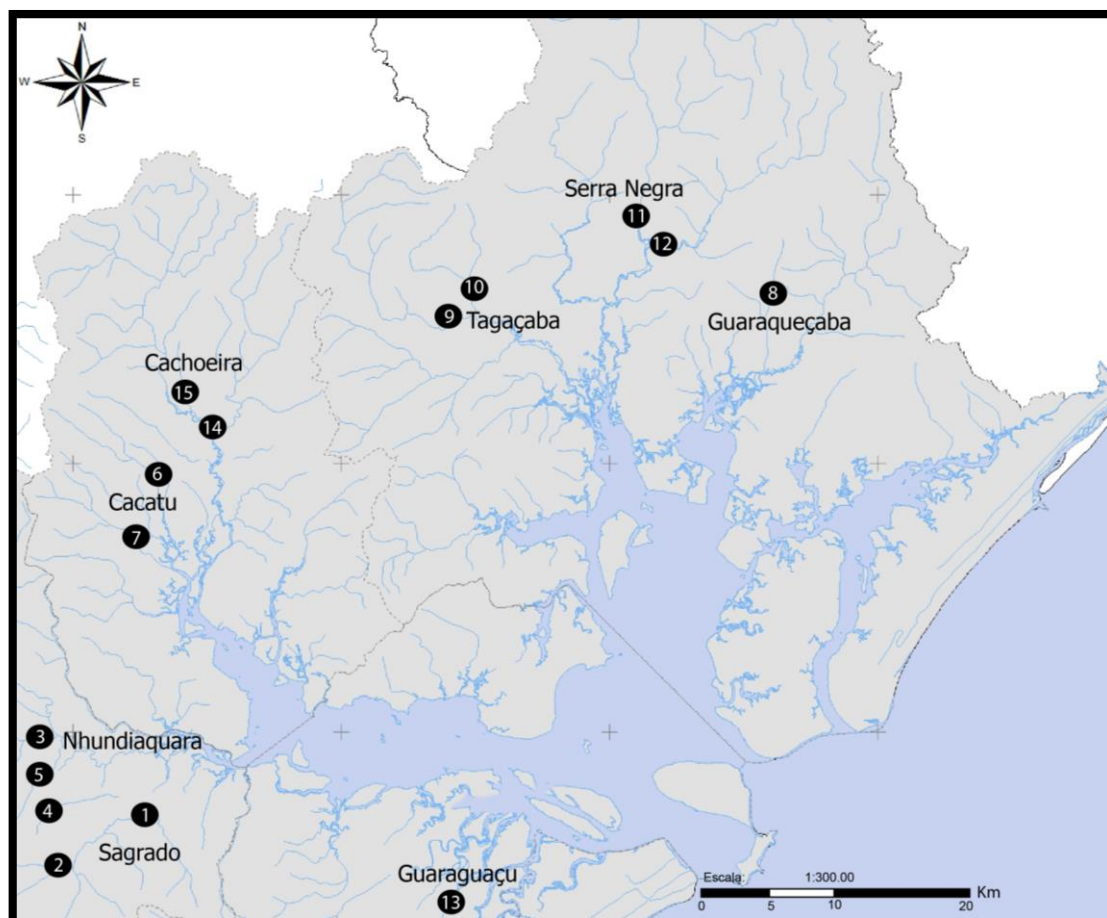


Fig. 1. Map illustrating of the Paraná Coastal Plain. The numbers indicate the studied rivers. 1) Sagrado River; 2) Meio River; 3) Marumbi River; 4) Pinto River; 5) Passa Sete River; 6) Nunes River; 7) Cacatu River; 8) Morato River; 9) Capivari River; 10) Tagaçaba River; 11) Pederneiras River; 12) Bananal River; 13) Brejatuba River; 14) Saci River and 15) Mergulhão River.

Table 1. Geographic coordinates of each microbasin sampled in the present study, with information of rivers and municipality.

<i>Microbasin</i>	<i>River</i>	<i>Coordinate</i>	<i>Locality</i>
GUARAGUAÇU SAGRADO	Brejatuba	S 25° 38' 29,0" W 48° 37' 14,0"	Paranaguá, PR, Brazil
	Sagrado	S 25° 33' 23,9" W 48° 48' 04,9"	Morretes, PR, Brazil
		S 25° 32' 14,2" W 48° 46' 00,0"	
		S 25° 31' 34,6" W 48° 45' 03,2"	
NHUNDIAQUARA	do Meio	S 25° 33' 32,7" W 48° 48' 55,9"	Morretes, PR, Brazil
	Marumbi	S 25° 30' 31,4" W 48° 52' 30,2"	
		S 25° 30' 11,1" W 48° 51' 25,3"	
		S 25° 29' 10,4" W 48° 49' 48,0"	
	do Pinto	S 25° 32' 48,7" W 48° 51' 53,0"	
		S 25° 30' 50,3" W 48° 50' 34,2"	
CACATU	Passa Sete	S 25° 31' 35,0" W 48° 50' 20,0"	Antonina, PR, Brazil
		S 25° 32' 35,7" W 48° 50' 04,9"	
		S 25° 31' 32,9" W 48° 48' 22,9"	
		S 25° 31' 15,0" W 48° 47' 50,0"	
	Cacatu	S 25° 19' 25,0" W 48° 45' 06,9"	
TAGAÇABA	do Nunes	S 25° 20' 19,2" W 48° 47' 04,6"	Antonina, PR, Brazil
	Tagaçaba	S 25° 11' 38,7" W 48° 31' 17,8"	
	Capivari	S 25° 11' 03,4" W 48° 31' 22,8"	
SERRA NEGRA	Pederneiras	S 25° 08' 34,8" W 48° 23' 38,0"	Guaraqueçaba, PR, Brazil
	Bananal	S 25° 10' 41,5" W 48° 22' 51,4"	
		S 25° 10' 31,2" W 48° 22' 18,6"	
		S 25° 12' 48,8" W 48° 17' 52,6"	
GUARAQUEÇABA CACHOEIRA	Morato	S 25° 14' 13,9" W 48° 45' 09,9"	Guaraqueçaba, PR, Brazil
	Saci	S 25° 17' 37,8" W 48° 44' 23,7"	Guaraqueçaba, PR, Brazil
	Mergulhão		

The fish hosts were captured with electronarcosis equipment (electrofishing) following the standard methodology. The hosts were immediately placed individually in plastic containers, anaesthetized with benzocaine and subsequently euthanized with section of medulla. After this procedure, the fish and parasites sampled for molecular procedures were fixed in 95% ethanol, and the ones sampled for morphological procedures were fixed in 5% formalin.

Morphological processing of parasites

The parasites fixed in 5% formalin were used in the preparation of permanent slides using Gomori's trichrome dye and mounted in Canada balsam (Humason 1979). This dye is used for the observation of soft structures. Other species of parasites were mounted in Hoyer's (Humason 1979), for the analyses of sclerotized structures. The morphological study was performed with the aid of a digital camera (Olympus QColor 5) coupled to a microscope with phase contrast and/or DIC (Olympus BX 51). The holotypes, paratypes and testimony specimens slides will be deposited in the Helminthological Collection of the Oswaldo Cruz Institute.

Molecular Processing

The total DNA of parasites fixed in 95% ethanol was extracted using DNeasy kit (Qiagen) and Quelex (BioRad) adapted to monogenoids. For each parasite extracted, one testimony slide was confectioned with the haptor (posterior party of the body) of each specimen separated from the rest of the body and used in the identification of the species. In oviparous species, only the central part of the trunk was used for DNA extraction. The haptor structures and male copulatory organ (MCO), located on the front, were mounted with Hoyer's. The internal transcribed spacer region (*ITS*) and the mitochondrial cytochrome oxidase subunit II (*COII*) gene regions were amplified. The markers used to amplify the *ITS* region were: ITS1A (5'-GTAACAAGGTTTCCGTAGGTG-3') and ITS2 (5'-TCCTCCGCTTAGTGATA -3') (Matějusková, Gelnar, McBeath and Collins, 2001). For the *COII*, the markers used were: COX2F2 (5'-TTTCACTGAGATAAGTCGTAAC-3'), combined with COX2R (5'-AATAMWKATWGGCATTRWAAGARTG-3') (Bueno-Silva and Boeger 2014).

The polymerase chain reaction (PCR) for both marker was performed with the following program: initial denaturation at 95 °C for 5 min followed by 40 cycles as follows: denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 49 °C (*ITS*) and 42°C (*COII*) for 45

s, extension at 72 °C for 45 s, and final extension 72 °C for 5 min. PCR was achieved in 25 µl containing 20 - 40 ng of template DNA, 3 mM MgCl₂, 1× PCR – Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0.5 pmoles of each primer, 0.4 mM dNTP, and 1U Platinum Taq polymerase (Invitrogen) in a total volume of 25 µl.

Confirmation of the amplification of the fragments by PCR was achieved through electrophoresis in a 1.5% agarose gel, subsequent staining in ethidium bromide and visualization under UV light. Amplified products were purified with the MinElute kit (Qiagen). The sequencing reactions were analyzed in an automatic sequencer, ABI 3130 (Applied Biosystems).

Distance barcode Analyses

Barcode distance analyses of parasites, based on internal transcribed spacer 1 (*ITS*), were performed with 16 oviparous Gyrodactylidae species and 3 viviparous Gyrodactylidae species. The analyses of the mitochondrial marker, cytochrome oxidase subunit II (*COII*), were performed with 9 oviparous species and 3 viviparous species. The DNA sequences of parasites were edited with the BioEdit v.7.0.9 (Hall 1999) and Geneious v.4.5 programs (<http://www.geneious.com/>, Drummond et al. 2011). The final alignment was obtained with MEGA version 6 (Tamura et al. 2013). Distance analysis (Neighbor-Joining) of the parasite genes was performed with MEGA version 6 software (Tamura et al. 2013) using the model Maximum Composite Likelihood (Tamura et al. 2004), 1,000 repetitions and removing ambiguous positions for each pair of initialization sequence. All sequences included in the phylogenetic analysis were produced in this study. The result of the neighbor-joining analysis represents intra and interspecific distances.

RESULTS

Diversity

Seven hundred and seventy five specimens of host fish were collected (Table 2), distributed in six species of Loricariidae: *Ancistrus multispinis* (Regan, 1912), *Kronichthys lacerta* (Nichols, 1919), *Pareiorhaphis* cf. *azygolechis* (Pereira et Reis, 2002) *Pareiorhaphis splendens* (Bizerril, 1995) *Rineloricaria* sp. and *Schizolecis guntheri* (Miranda Ribeiro, 1918), a species belonging to the Characidae: *Mimagoniates microlepis* (Steindachner, 1877), and one belonging to the Callichthyidae: *Scleromystax barbatus* (Quoy et Gaimard, 1824).

Table 2. List of species of host fishes captured in the coast of Paraná with order and family information for each species. The “*n*” values indicate the number of all individuals collected for each host species in coast.

Hosts	Family	Order	<i>N</i>
<i>Ancistrus multispinis</i>	Loricariidae	Siluriformes	45
<i>Kronichthys lacerta</i>	Loricariidae	Siluriformes	43
<i>Pareiorhaphis splendens</i>	Loricariidae	Siluriformes	40
<i>Pareiorhaphis</i> cf. <i>azygolechis</i>	Loricariidae	Siluriformes	25
<i>Schizolecis guntheri</i>	Loricariidae	Siluriformes	3
<i>Rineloricaria</i> sp.	Loricariidae	Siluriformes	225
<i>Scleromystax barbatus</i>	Callichthyidae	Siluriformes	243
<i>Mimagoniates microlepis</i>	Characidae	Characiformes	151

Morphology

Were recovered from the body surface of the hosts 9,316 parasites, representing species of both the oviparous group and viviparous clade. All parasites collected in the eighth microbasin belong to Gyrodactylidae, totaling 22 species (Table 3), of which five are new oviparous species of *Phanerothecium* Kritsky et Thatcher, 1977, parasitizing *Rineloricaria* sp.. However, a specimen of *Phanerothecium* sp. n. 3 was found parasitizing *K. lacerta* in the Morato River (Guaraqueçaba Microbasin), a specimen of *Phanerothecium* sp. n. 4 parasitizing this same host in the Bananal River (Serra Negra Microbasin) and a specimen of *Phanerothecium* sp. n. 5 parasitizing an unidentified host in the Marumbi River (Nhundiaquara Microbasin). In addition, three new species of *Aglaogyrodactylus* Kritsky, Vianna et Boeger 2007 were found in in *P. splendens*: *Aglaogyrodactylus* sp. n. 2, *Aglaogyrodactylus* sp. n. 4, and *Aglaogyrodactylus* sp. n. 6. *Aglaogyrodactylus* sp. n. 4 was also found in one specimen of *A. multispinis* in the Morato River (Guaraqueçaba Microbasin). These three new species also found in *P. cf. azygolechis* in the Brejatuba River (Guaraguaçu Microbasin).

Furthermore, known representatives of the *Aglaogyrodactylus* spp. were identified: *Aglaogyrodactylus coneii* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007 parasitizing *P. cf. azygolechis* in the Brejatuba River (Guaraguaçu Microbasin). *Aglaogyrodactylus ctenistus* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007 parasitizing *P. splendens* in Marumbi River (Nhudiaquara River). *Aglaogyrodactylus forficulatus* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007 and *Aglaogyrodactylus forficuloides* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007 parasitizing *K.*

lacerta and *P. splendens* in almost all sampled rivers. *Aglaiogyrodactylus forficulatus* and *A. forficuloides* were also found parasitizing *Rineloricaria* sp.. Specimens of *Aglaiogyrodactylus guttus* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007 were found parasitizing *S. guntheri* in Capivari River (Tagaça Microbasin) and an unidentified host in the Morato River (Guaraqueçaba Microbasin). *Aglaiogyrodactylus pedunculatus* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007 parasitizing *K. lacerta* in the Pederneiras River (Serra Negra Microbasin) and an unidentified host in the Cacatu River (Cacatu Microbasin). Species of *Onychogyrodactylus*, *O. hydaticus* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007 and *O. sudis* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007 parasitizing *A. multispinis* in all rivers studied.

Table 3. List of Gyrodactylidae species in the coast of Paraná, with group information that belongs each species. The “*n*” values indicate the number of all individuals collected for each gyrodactylids species in coast.

	Parasite	<i>n</i>
Oviparous species	<i>Aglaiogyrodactylus coneii</i>	40
	<i>Aglaiogyrodactylus ctenistus</i>	58
	<i>Aglaiogyrodactylus forficuloides</i>	93
	<i>Aglaiogyrodactylus forficulatus</i>	246
	<i>Aglaiogyrodactylus guttus</i>	8
	<i>Aglaiogyrodactylus pedunculatus</i>	8
	<i>Aglaiogyrodactylus</i> sp. n. 2	21
	<i>Aglaiogyrodactylus</i> sp. n. 4	25
	<i>Aglaiogyrodactylus</i> sp. n. 6	7
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 1	35
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 2	136
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 3	44
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 4	89
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 5	2
	<i>Onychogyrodactylus hydaticus</i>	50
	<i>Onychogyrodactylus sudis</i>	131
Viviparous species	<i>Anacanthocotyle</i> sp.	3
	<i>Gyrodactylus scleromystaci</i>	40
	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 4	1
	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 5	17
	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 8	37
	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 9	14

The identification of the *Aglaiogyrodactylus* species was based in the form of MCO. Most species of this genus showed tubular copulatory organ sclerotized or not

and accessory piece comprised of one or more diverging branches. The morphology of the hooks is extremely similar between species of the genus. *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 2 is proposed as new in this study based mainly on the branched morphology of the sclerotized MCO (Fig. 2.5) and hook very similar of the other known species to genus (Fig. 2.6). *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 4 is characterized by the morphology of the structures of the haptor (hooks and anchors); in this species, hook (Fig 2.1) with point recurved and anchors (Fig. 2.2) significantly reduced in size when compared to the size of the haptor (Fig. 2.4). Finally, *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 6 is considered a unique and new taxonomic unity based solely on the morphology of the hook, with elongate, delicate shaft, unlike all other species known in the genus (Fig. 2.3).

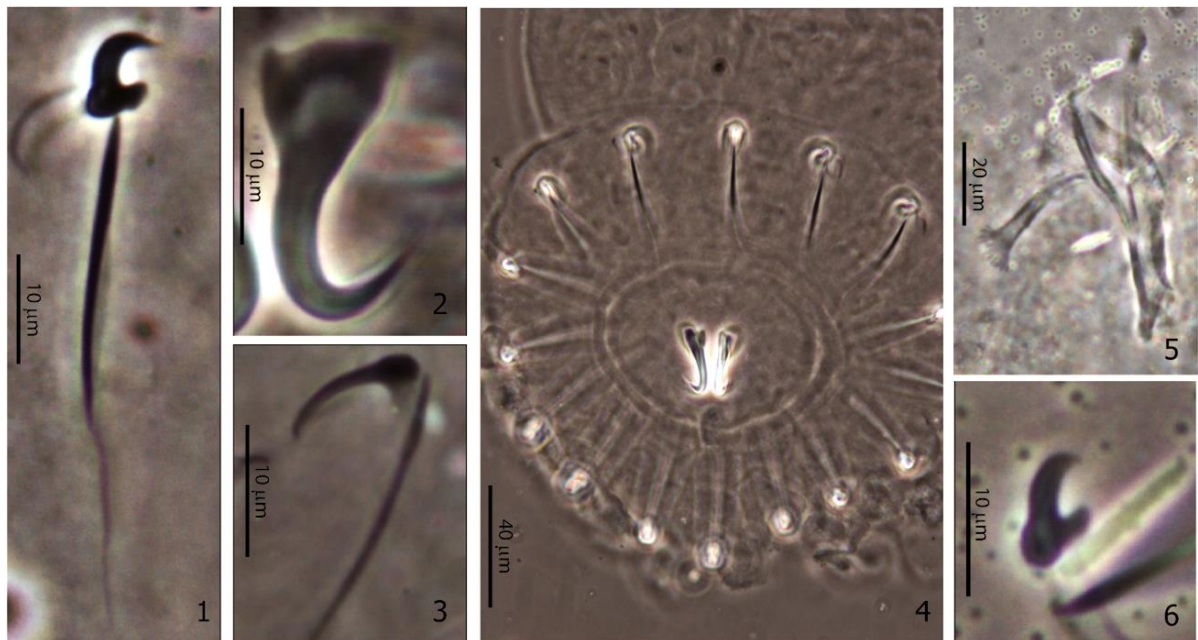


Fig. 2. Phase contrast photomicrographs of male copulatory organs and haptoral structures of *Aglaiogyrodactylus* spp. (1) Hook of *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 4; (2) Anchor of *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 4; (3) Hook of *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 6; (4) Haptoral structures of *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 4; (5) Male copulatory organ of *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 2 and (6) Hook of *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 2.

The identification of the described species of *Phanerothecium* was all based on the number, size and morphology of spines of the MCO. Some species already described for this genus have very similar spines (e.g. *Phanerothecium spinatoides* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007, *Phanerothecium spinatus* Boeger, Kritsky et Belmont-Jégu, 1994) and some of the species identified herein may represent specimens of these but we preferred to consider them as unknown entities for the time being, until a more adequate study is performed. *Phanerothecium* sp. n. 1 is characterized by an uncoiled portion of the MCO armed with minute spines, densely packed (Fig. 3.1).

Phanerothecium sp. n. 2 presents a loop of the MCO armed with medium sized spines, distantly spaced from each other, and presenting a distal hook-like structure (Fig. 3.2). *Phanerothecium* sp. n. 4 is unique by presenting a straight duct of the MCO heavily armed with very large spines, densely packed (Fig. 3.3). The MCO of *Phanerothecium* sp. n. 5 is armed by densely packed filiform spines (Fig. 3.4). Finally, *Phanerothecium* sp. n. 3, likely a member of *P. spinatoides*, presents a MCO armed with medium spines, densely packed (Fig. 3.5).

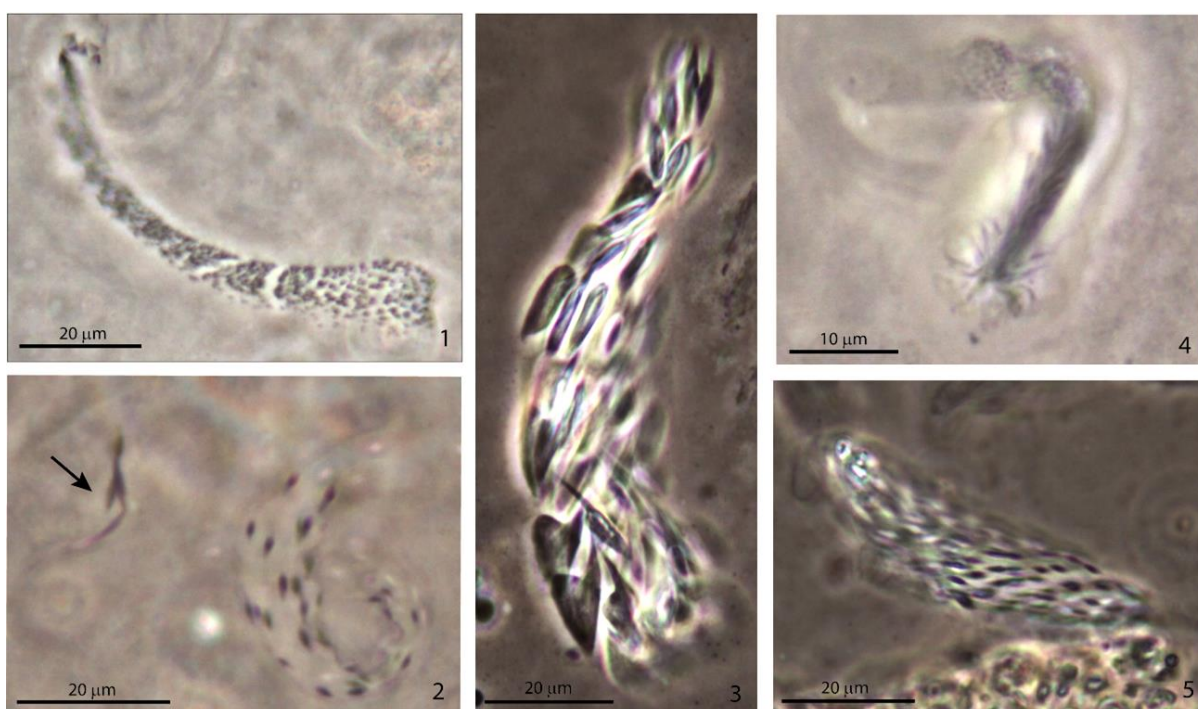


Fig. 3. Phase contrast photomicrographs of male copulatory organs (MCO) of *Phanerothecium* spp. (1) *Phanerothecium* sp. n. 1; (2) *Phanerothecium* sp. n. 2; (3) *Phanerothecium* sp. n. 4; (4) *Phanerothecium* sp. n. 5, and (5) *Phanerothecium* sp. n. 3.

For the viviparous clade three new species of *Gyrodactylus* were found, identified as *Gyrodactylus* sp. n. 5 and sp. n. 8 (parasitizing *P. splendens*), *Gyrodactylus* sp. n. 9 (parasitizing *M. microlepis*), besides *Gyrodactylus* sp. n. 4 identified by Bueno-Silva (2011) (parasitizing *S. barbatus*) and a new species of *Anacanthocotyle* Kritsky et Fritts, 1970 (parasitizing *M. microlepis*). *Gyrodactylus scleromystaci* Bueno-Silva et Boeger, 2014 was also found, parasitizing *S. barbatus*. All viviparous species were found parasitizing their respective host in all microbasin where these were presented. The exception was *Gyrodactylus* sp. n. 4, which was found only in Marumbi River.

The proposal of *Gyrodactylus* sp. n. 5 and *Gyrodactylus* sp. n. 8 (Fig. 4.1 - 4.2) as separate entities is based on subtle putative differences in the morphology of

anchors and hooks. A small variation found mainly in the hooks of some specimens was decisive for the putative separation of these species. Although these species are very similar to each other, they can be differentiated from the remaining species of *Gyrodactylus* known in South America by shape of the hooks. The species of *Gyrodactylus bueni*, *Gyrodactylus major*, *G. scleromystaci* described by Bueno-Silva 2014 for *Scleromystax* spp., differ from the new species by the shape of the hooks with heel convex and shelf convex (hooks with heel straight and shelf straight in *G. bueni*), and anchors with superficial root curved (anchors with superficial root slender and relatively longer in *G. bueni*). From *G. major*, *G. scleromystaci* differs by having hooks with shaft comparatively thicker, point recurved and toe pointed (hooks with proximal shaft straight and toe concave in *G. major*) *Gyrodactylus* sp. n. 9 is considered a new taxonomic entity mainly by the morphology of the hook, with an evenly curved shaft and point, an inconspicuous thumb, a pronounced heel, and a somewhat straight base (Fig. 4.3).

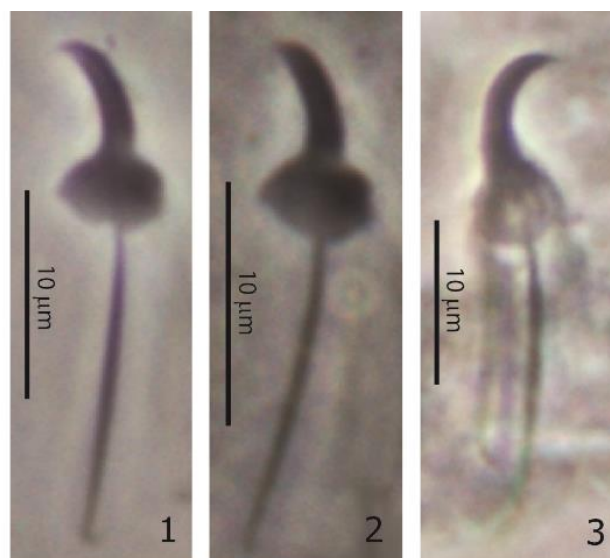


Fig. 4. Phase contrast photomicrographs of the hook structures of *Gyrodactylus* spp. (1) *Gyrodactylus* sp. n. 5; (2) *Gyrodactylus* sp. n. 8 and (3) *Gyrodactylus* sp. n. 9.

Molecular Processing

Total DNA was extracted from 378 specimens of gyrodactylids. The analysis of the *ITS* region was performed with 81 specimens of the oviparous group and 6 specimens of the viviparous clade. For the *COII* gene, 61 specimens of the oviparous

group and 16 viviparous specimens were used. None of the two markers was efficiently in the amplification of *Gyrodactylus* sp. n. 9 and *Anacanthocotyle* sp. n. 1.

Barcode distance Analyses

The phylogenetic analysis of the *ITS* region of oviparous species was performed only with those sequences that showed high quality and a size of approximately 800 bp. For the viviparous species, sequences used were approximately 1,400 bp long. The phylogeny of the *COII* gene was done with fragments of approximately 620 bp. For viviparous species, fragments of 570 bp were used. All of the sequences that did not have reliable nucleotide information or had shorter length, than those mentioned above, were not considered in the analysis.

The Neighbor-joining analysis of the oviparous Gyrodactylidae species based on the fragment of *ITS* (Fig. 5) resulted in two groups. The mean genetic distance of these, species are represented in Table 4. The first (Fig.5.A) one formed by *Aglaiogyrodactylus* spp. (*A. ctenistus*, *A. coneii*, *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 6, *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 4, *A. pedunculatus*, *A. guttus*, *A. forficulatus*, *A. forficuloides* and *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 2) with 50% of bootstrap, including *O. hydaticus* with 100% of bootstrap, and intraspecific mean genetic distance ranged from 0 to 17.8%. *Aglaiogyrodactylus ctenistus* sister group of *A. coneii*, with 100% of bootstrap, and interspecific mean genetic distance between these species ranged from 2.4 to 3.2%. The nearest group in the dendrogram, *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 6, presented 100% of bootstrap, intraspecific mean genetic distance of 0%. This species showed interspecific mean genetic distance with *A. ctenistus* ranged from 8.2 to 8.7% and with *A. coneii* was 7.8%. *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 4 showed 100% of bootstrap, and intraspecific mean genetic distance ranged from 0 to 0.3%. The nearest group in the dendrogram, *A. ctenistus*, *A. coneii* and *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 6, presented 99% of bootstrap. The interspecific mean genetic distance between this species with *A. ctenistus* ranged from 12.7 to 14.6%, with *A. coneii* ranged from 13.5 to 14.9% and *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 6 ranged from 14.5 to 16.1%. *Aglaiogyrodactylus pedunculatus* sister group of *A. guttus*, *A. forficulatus* and *A. forficuloides*, with 39% of bootstrap, and intraspecific mean genetic distance was 0%. The interspecific mean distance between this species with *A. guttus* ranged from 26.2 to 26.7%, with *A. forficulatus* ranged from 22.5 to 23.2% and *A. forficuloides* ranged from 22.5 to 23.9%.

Aglaiogyrodactylus sp. n. 2 showed 100% of bootstrap, and intraspecific mean genetic distance ranged from 0 to 0.1%. The nearest group in the dendrogram, are all *Aglaiogyrodactylus* species and *O. hydaticus*, presented 100% of bootstrap, and intraspecific mean genetic distance ranged from 0 to 17.8%. The interspecific mean distance of these two species ranged from 30.4 to 37.5%.

The second group (Fig. 5.B), formed by *Phanerothecium* spp. (*Phanerothecium* sp. n. 3, *Phanerothecium* sp. n. 1, *Phanerothecium* sp. n. 5, *Phanerothecium* sp. n. 4 and *Phanerothecium* sp. n. 2) with 100% of bootstrap, including *O. sudis*, with 100% bootstrap and intraspecific mean genetic distance ranged from 0 to 1.3%. The sister group in the dendrogram with 42% of bootstrap, *Phanerothecium* sp. n. 2 and *Phanerothecium* sp. n. 4. *Phanerothecium* sp. n. 2 presented bootstrap of 100% and mean genetic distance intraspecific of 0% and *Phanerothecium* sp. n. 4 bootstrap was 96% and presented intraspecific mean genetic distance of 0%. The interspecific mean distance between *O. sudis* with *Phanerothecium* sp. n. 2 ranged from 4.5 to 10.9 and with 8.4 to 9.0%. *Phanerothecium* sp. n. 5, presented 100% of bootstrap and genetic mean distance intraspecific of 0%. The nearest group in the dendrogram, *Phanerothecium* sp. n. 1 with 45% of bootstrap. *Phanerothecium* sp. n. 1 presents 100% of bootstrap and intraspecific mean genetic distance ranged from 0 to 0.3%. The interspecific mean distance between these two species ranged from 7.8 to 8.6%. *Phanerothecium* sp. n. 3 presents intraspecific mean genetic distance of 0% and is nearest from *Phanerothecium* sp. n. 1, *Phanerothecium* sp. n. 5, *Phanerothecium* sp. n. 4, *Phanerothecium* sp. n. 2 and *O. sudis*.

The Neighbor-joining analysis of the oviparous Gyrodactylidae species based on the fragment of mtDNA *COII* gene (Fig. 6) resulted in two groups. The mean genetic distance of these, species were represented in Table 5. The first (Fig.6.A) formed by *Aglaiogyrodactylus* spp. (*A. forficulatus*, *A. forficuloides*, *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 4 and *A. ctenistus*), with bootstrap of 100%. *Aglaiogyrodactylus forficulatus* presented 100% of bootstrap and intraspecific mean genetic distance ranged from 0 to 0.5%. The nearest group in the dendrogram, *A. forficuloides* presented 100% of bootstrap and the intraspecific mean genetic distance ranged from 0 to 10.6%. The interspecific mean genetic distance between these species ranged from 15.2 to 18.3%. *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 4 presented intraspecific mean genetic distance of 0%. The nearest group in the dendrogram, *A. ctenistus*, showed bootstrap of 100% and

intraspecific mean genetic distance ranged from 0 to 2%. The interspecific mean distance between these two species ranged from 38.5 to 40.4%.

The second (Fig.6.B) group was formed by *O. sudis*, with 99% of bootstrap and mean genetic distance ranged from 0 to 10.6%, and the *Phanerothecium* spp. (*Phanerothecium* sp. n. 5, *Phanerothecium* sp. n. 3, *Phanerothecium* sp. n. 4 and *Phanerothecium* sp. n. 2), which were grouped with 50% of bootstrap. *Phanerothecium* sp. n. 5 presented mean genetic distance of 0%. The nearest group in the dendrogram, *Phanerothecium* sp. n. 3, presented 55% of bootstrap and mean genetic distance intraspecific of 0%. The interspecific mean distance between these two species of 37.1%. *Phanerothecium* sp. n. 4 presented 100% of bootstrap and mean genetic distance ranged from 0 to 0.3%. The nearest group in the dendrogram, *Phanerothecium* sp. n. 2, presented bootstrap of 99% and mean genetic distance ranged from 0 to 2.2%. The interspecific mean distance between these two species ranged from 10.2 to 12.6%.

The viviparous species clade analyzed with *ITS* (Fig. 7) grouped the species of *Gyrodactylus* sp. n. 8, with intraspecific mean genetic distance of 0%, and *Gyrodactylus* sp. n. 5, with intraspecific mean genetic distance of 0%. The interspecific mean distance between these two species was 0%. The *Gyrodactylus* sp. n. 4 species were grouped separately and presented intraspecific mean genetic distance of 0%. The interspecific mean distance between *Gyrodactylus* sp. n. 4 and *Gyrodactylus* sp. n. 8 was 39.3%; as well as *Gyrodactylus* sp. n. 4 and *Gyrodactylus* sp. n. 5. The mean genetic distance of these, species were represented in Table 6.

In the phylogenetic analysis of the *COII* gene (Fig. 8), the species of *G. scleromystaci* formed a clade with 100% bootstrap and presented intraspecific mean genetic distance ranged from 0 to 11%. The *Gyrodactylus* sp. n. 8 and *Gyrodactylus* sp. n. 5 species were grouped in another clade with 99% of bootstrap. *Gyrodactylus* sp. n. 8 presented intraspecific mean genetic distance ranged from 0.4 to 11% and *Gyrodactylus* sp. n. 5 of 0.6%. The interspecific mean distance of these two species ranged from 0.2 to 11%. The mean genetic distance of these, species were represented in Table 7.

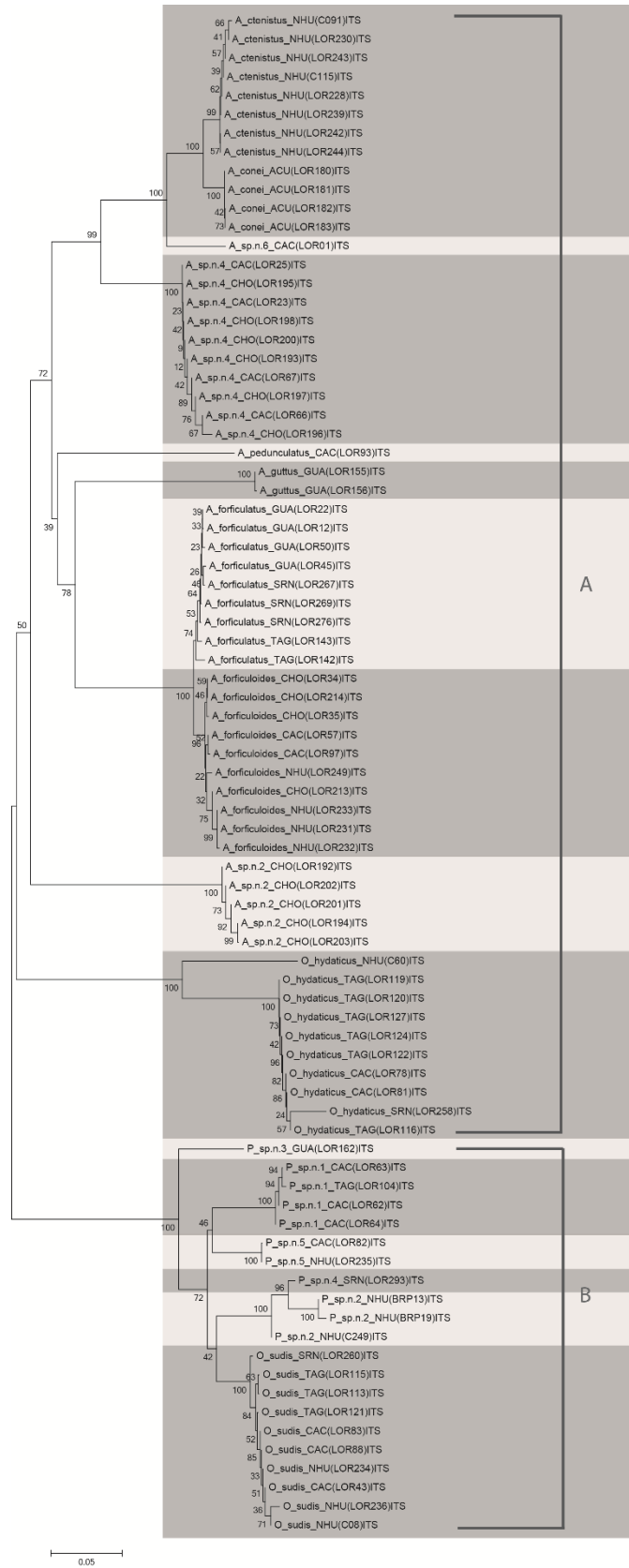


Fig. 5. Neighbor-joining phylogenetic analysis of the oviparous Gyrodactylidae species, performed based on Maximum Composite Likelihood (Tamura et al. 2004) model for *ITS* rDNA to represent intra- and interspecific distances. (A) indicates the clade formed by *Aglaiogyrodactylus* species with *O. hydaticus* and (B) clade formed by *Phanerothecium* species with *O. sudis*. Bootstrap values ($n = 1,000$).

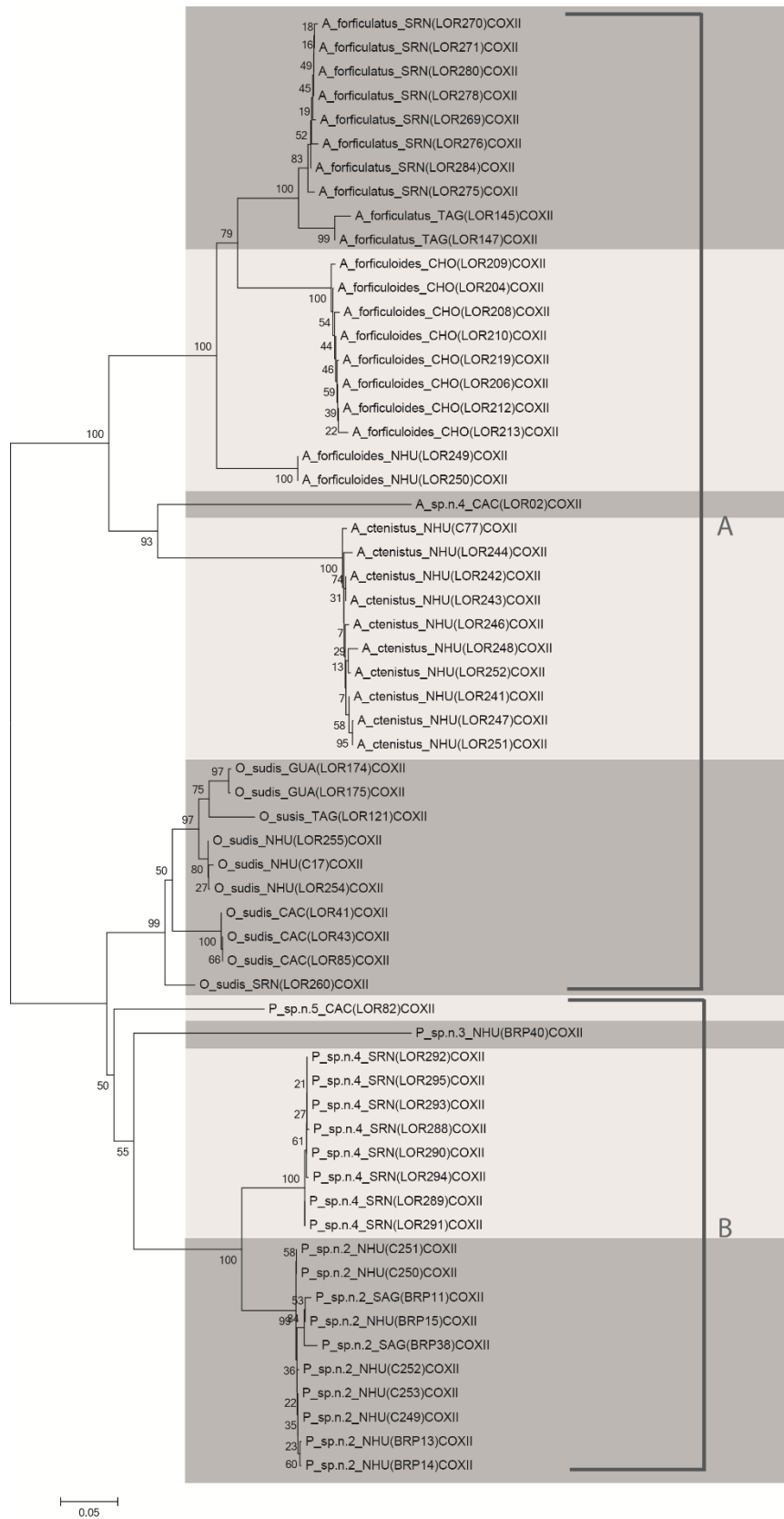


Fig. 6. Neighbor-joining phylogenetic analysis of the oviparous Gyrodactylidae species, performed based on Maximum Composite Likelihood (Tamura et al. 2004) model for mtDNA *COII* to represent intra- and interspecific distances. (A) indicates the clade formed by *Aglaiogyrodactylus* species and (B) clade formed by *Phanerothecium* species with *O. sudis*. Bootstrap values ($n = 1,000$).

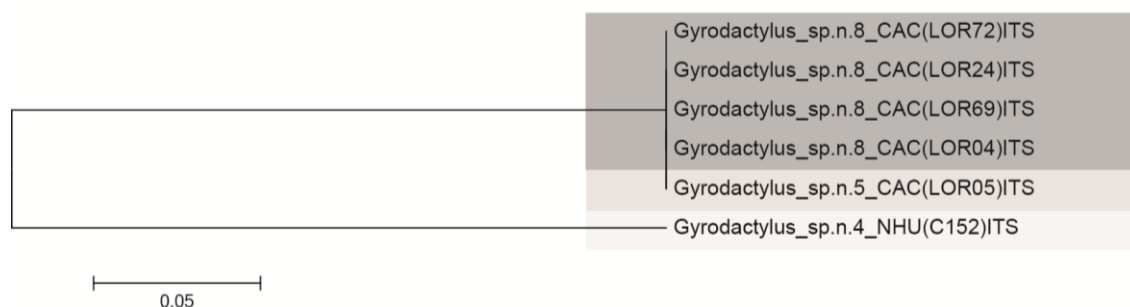


Fig. 7. Neighbor-joining phylogenetic analysis of the viviparous Gyrodactylidae species, performed based on Maximum Composite Likelihood (Tamura et al. 2004) model for *ITS* rDNA, to represent distances intra- and interspecific. Bootstrap values (n = 1,000).

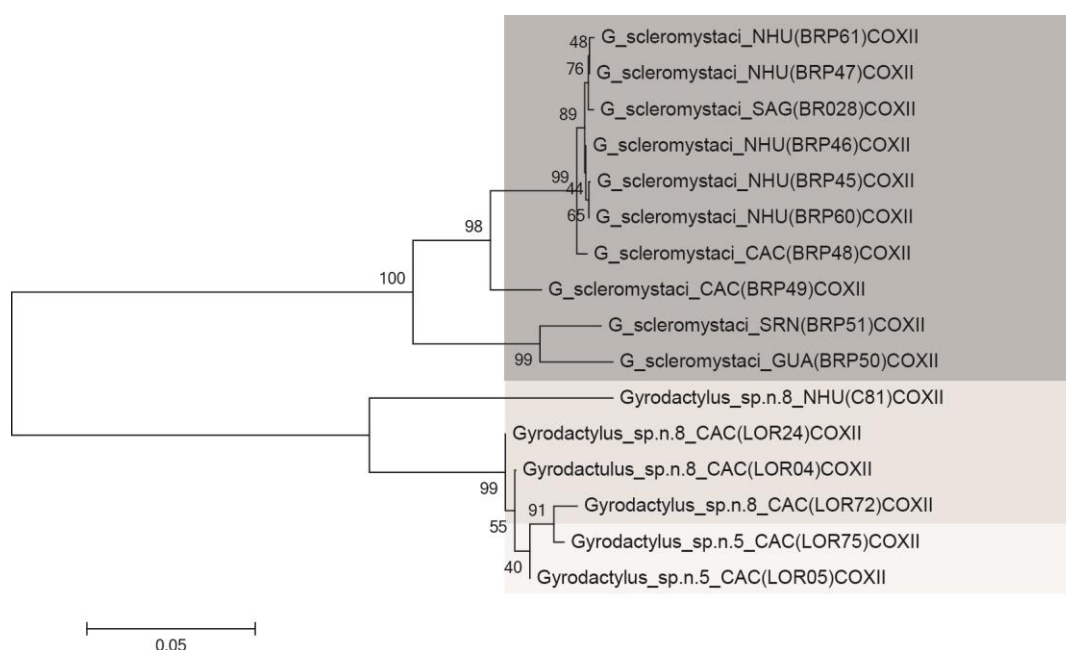


Fig. 8. Neighbor-joining phylogenetic analysis of the viviparous Gyrodactylidae species, performed based on Maximum Composite Likelihood (Tamura et al. 2004) model for mtDNA *COII* to represent distances intra- and interspecific. Bootstrap values (n = 1,000).

DISCUSSION

Morphological and molecular data supports the presence of eight known species of oviparous (*A. conej*, *A. ctenistus*, *A. forficulatus*, *A. forficuloides*, *A. guttus*, *A. pedunculatus*, *O. hydaticus*, and *O. sudis*) and one viviparous gyrodactylid (*G. scleromystaci*). Eight new oviparous species were suggested by morphology and supported by the molecular barcode analysis: *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 2, *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 4, *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 6, *Phanerothecium* sp. n. 1, *Phanerothecium* sp. n. 2, *Phanerothecium* sp. n. 3, *Phanerothecium* sp. n. 4 and

Phanerothecium sp. n. 5 and four new viviparous species: *Anacanthocotyle* sp. n. 1, *Gyrodactylus* sp. n. 4, *Gyrodactylus* sp. n. 5 and *Gyrodactylus* sp. n. 9.

Some new species proposed for *Phanerothecium* in these study have spines similar to other species already described for this genus (e.g. *P. spinatoides*, *P. spinatus*). Further, taxonomic confirmation will be performed in future studies by comparison with the type specimens and additional sequences from specimens obtained from the each respective host and type locality.

The barcode analyses, however, rejected the identity of *Gyrodactylus* sp. n. 5 and *Gyrodactylus* sp. n. 8 united into a single species using the first species notation. The subtle variation observed initially considered likely represent intraspecific characteristics and do not support their morphological identity. This result does not contradict the importance of the morphology of the form of the hooks on the identification and determination of species of *Gyrodactylus*, as suggested by many authors (Malmberg 1970, Huyse and Volckaert 2002, Cable et al. 2005), only confirms that the uncertainties associated with the description of the hard structures form present in viviparous species should be repaired through the use of barcodes markers.

While the *COII* gene showed better resolution for species, amplification of gyrodactylids was most efficient with *ITS*. Primers of the *ITS* fragment amplified some species that was not possible with the marker mtDNA *COII* (*A. coneii*, *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 6, *A. guttus*, *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 2, *O. hydaticus* and *Phanerothecium* sp. n. 1). All other species were amplified equally by the two markers. The alignment of the species amplified with the *COII* was obviously easier and more robust than the alignment with *ITS*. The problem of *ITS* is the high genetic variability in the *ITS-1* portion; this region presents many gaps, which complicates the alignment and analyses. Cable et al. (1999), indicate that the *ITS-2*, combined with the 5.8S rDNA, appeared to be the most informative indicator of phylogenetic relationships within *Gyrodactylus* than *ITS-1*. According Hansen et al. (2007), in the case of studies on *G. salaris* and *G. thymalli*, the mitochondrial cytochrome oxidase I (*COI*) gene can reveal considerably higher levels of diversity than nuclear ribosomal markers.

The *COI* gene is most commonly used for the barcoding of eukaryotes (Hebert et al. 2003). According Meinilä et al. (2002) the available primers for amplifying cytochrome oxidase I (*COI*) gene of *Gyrodactylus* spp. seem to work only on a limited number of species, apparently because of interspecific molecular variability. Because

of this difficulty, Bueno-Silva and Boeger (2014) proposed the fragment of the cytochrome oxidase II (*COII*) gene as an additional marker for barcoding viviparous gyrodactylids. The *COII* gene has been successfully used as a molecular marker in phylogenetic reconstructions and evolutionary studies for various species of animals (Spicer 1995, Adkins et al. 1996, Frati et al. 1997, Caterino and Sperling 1999, Pruess et al. 2000, Piaggio and Spicer 2001, Rawson and Burton 2006).

In this study we note that the number of representatives of oviparous was greater than viviparous Gyrodactylidae. According Boeger et al. (2003), the oviparous species are limited to hosts with hard surfaces, characteristic of Loricariidae species. According to these authors, the droplet produced at the tip of the eggs of oviparous restricts the exchange of host for those with this characteristic.

All oviparous species collected in this study were found on Loricariidae hosts. However, the viviparous species were found in hosts representing the three families sampled. Kritsky et al. (2007), also collected oviparous species mostly on loricarids hosts, with only one, *Phanerothecioides agostinhoi* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007, found on *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766), a Pimelodidae. The only previous records of an oviparous gyrodactylids from another fish group are *Phanerothecium caballeroi* Kritsky et Thatcher, 1977 and *Phanerothecium* sp. from *Zungaro zungaro* (Humboldt, 1821), a demersal pimelodid catfish occurring sympatrically with loricariids in Colombia (Kritsky and Thatcher 1977).

In summary, the combined use of morphological and molecular methodologies is ideal for determining species of Gyrodactylidae. Most of the descriptions for Gyrodactylidae species proposals have been based on morphology, the parts sclerotizeds of component of posterior fixation organ (haptor), and MCO for oviparous species. Linear and angular distances measurements are also applied for these purposes. Abiotic environmental factors, such as ambient temperature, also affect the size mainly of sclerites, which makes the morphometric study of these species even more prone to error. Therefore, the use of barcode markers is desirable to reduce erroneous identifications, something that occurs frequently in this group.

REFERENCES

- ADKINS R.M., HONEYCUTT R.L., DISOTELL T.R. 1996: Evolution of eutherian cytochrome c oxidase subunit II: heterogeneous rates of protein evolution and altered interaction with cytochrome c. *Mol. Biol. Evol.* 13: 1393-1404.
- BAKKE T.A., HARRIS P.D., CABLE J. 2002: Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans. *Int. J. Parasitol.* 32: 281-308.
- BOEGER W.A., KRITSKY D.C., BELMONT-JÉGU E. 1994: Neotropical Monogenoidea. 20. Two new species of oviparous Gyrodactylidea (Polyonchoinea) from loricariid catfishes (Siluriformes) in Brazil and the phylogenetic status of Ooegyrodactylidae Harris, 1983. *J. Helminth. Soc. Washington.* 61: 34-44.
- BOEGER W.A., KRITSKY D.C. 2001: Phylogenetic relationships of the Monogenoidea. In D. T. J. Littlewood & R. A. Bray (Eds) *Interrelationships of the Platyhelminthes*, London: Taylor & Francis. 92-102.
- BOEGER W.A., KRITSKY D.C., PIE M.R. 2003. The context of diversification of the viviparous Gyrodactylidae. *Zool. Scr.* 32: 437-448.
- BOEGER W.A., KRITSKY D.C., PIE M.R., ENGERS K.B. 2005: Mode of transmission, host switching, and escape from the Red Queen by viviparous gyrodactylids (Monogenoidea). *J. Parasitol.* 91: 1000-1007.
- BONETTO A.A. 1986: The Paraná river system. In *The ecology of river systems* (B.R. Davies & K.F. Walker, eds.). Dr. W.Junk Publishers, Dordrecht. 541-555.
- BROOKS D.R., MCLENNAN D.A. 1993: Comparative study of adaptative radiations with an example using parasitic flatworms (Platyhelminthes: Cercomeria). *Am. Nat.* 142: 755-778.
- BUENO-SILVA M., 2007: Especiação incipiente de *Gyrodactylus* (Monogenoidea) em espécies simpátricas de *Corydoras* (Siluriformes)?. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- BUENO-SILVA M., BOEGER W.A., PIE M.R. 2011: Choice matters: Incipient speciation in *Gyrodactylus corydori* (Monogenoidea: Gyrodactylidae). *Int. J. Parasitol.* 41: 657-667.
- BUENO-SILVA M., BOEGER W.A. 2014: Neotropical Monogenoidea. 58. Three new species of *Gyrodactylus* (Gyrodactylidae) from *Scleromystax* spp. (Callichthyidae)

- and the proposal of COII gene as an additional fragment for barcoding gyrodactylids. *Folia Parasit.* 61: 213-222.
- BUSH A.O., LAFFERTY K.D.L., LOTZ J.M., SHOSTAK A.W. 1997: Parasitology meets ecology on terms: Margolis et al. Revisited. *J. Parasitol.* 83: 575-583.
- CABLE J., HARRIS P.D., TINSLEY R.C., LAZARUS C.M. 1999: Phylogenetic analysis of *Gyrodactylus* spp. (Platyhelminthes: Monogenea) using ribosomal DNA sequences. *Can. J. Zool.* 77: 1439-1449.
- CABLE J., HARRIS P.D. 2002: Gyrodactylid developmental biology: historical review, current status and future trends. *Int. J. Parasitol.* 32: 255-280.
- CABLE J., VAN OOSTERHOUT C., BARSON N., HARRIS P.D., 2005: *Gyrodactylus pictae* n. sp. (Monogenea: Gyrodactylidae) from the Trinidadian swamp guppy *Poecilia picta* Regan, with a discussion on species of *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832 and their poeciliid hosts. *Syst. Parasitol.* 60: 159-164.
- CATERINO M.S., SPERLING F.A. 1999: *Papilio* phylogeny based on mitochondrial cytochrome oxidase I and II genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 11: 122–137.
- CONE D.K., ABBOTT C., GILMORE S., BURT M.D. 2010: A new genus and species of gyrodactylid (Monogenea) from silver hake, *Merluccius bilinearis*, in the Bay of Fundy, New Brunswick, Canada. *J. Parasitol.* 96: 681-684.
- CUNNINGHAM C.O. 1997: Species Variation within the Internal Transcribed Spacer (ITS) Region of *Gyrodactylus* (Monogenea: Gyrodactylidae) Ribosomal RNA Genes. *J. Parasitol.* 83: 215-219.
- DÁVIDOVÁ M., JARKOVSKÝ J., MATĚJUSOVÁ I., GELNAR M. 2005: Seasonal occurrence and metrical variability of *Gyrodactylus rhodei* Žitňan 1964 (Monogenea, Gyrodactylidae). *Parasitol. Res.* 95: 398-405.
- DRUMMOND A.J., ASHTON B., BUXTON S., CHEUNG M., COOPER A., DURAN C., FIELD M., HELED J., KEARSE M., MARKOWITZ S., MOIR R., STONES-HAVAS S., STURROCK S., THIERER T., WILSON A. 2011: Geneious v5.4, Available from <http://www.geneious.com/>.
- FRATI F., SIMON C., SULLIVA N J., SWOFFORD D.L. 1997: Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene in Collembola. *J. Mol. Evol.* 44: 145-158.
- GARCÍA-VÁSQUEZ A., HANSEN H., CHRISTISON K.W., BRON J.E., SHINN A.P. 2011: Description of three new species of *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832

- (Monogenea) parasitizing *Oreochromis niloticus niloticus* (L.) and *O. mossambicus* (Peters) (Cichlidae). *Acta Parasitol.* 56: 20-33.
- HAHN C, BAKKER T.A., BACHMANN L., WEISS S., HARRIS P.D. 2011: Morphometric and molecular characterization of *Gyrodactylus teuchis* Lautraite, Blanc, Thiery, Daniel & Vigneulle, 1999 (Monogenea: Gyrodactylidae) from an Austrian brown trout population. *Parasitol. Int.* 60: 480-487.
- HANSEN H., BAKKE T.A., BACHMANN L. 2007: DNA taxonomy and barcoding of monogenean parasites: lessons from *Gyrodactylus*. *Trends Parasit.* 23: 363-367.
- HALL T.A. 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- HARRIS P.D. 1998. Extreme morphological variation between related individuals of *Gyrodactylus pungitti* Malmberg, 1964 (Monogenea). *Syst. Parasitol.* 39: 137-140.
- HEBERT P.D.N., RATNASINGHAM S., DE WAARD J.R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B (Supplement)* 270: S96-S99. doi: 10.1098/rsbl.2003.0025.
- HUMASON L. 1979: *Animal Tissue Techniques*. W.H. Freeman and Company, 4th ed. San Francisco, 661.
- HUYSE T., VOLCKAERT F.A.M. 2002: Identification of a host-associated species complex using molecular and morphometric analyses, with description of *Gyrodactylus rugiensoides* n. sp. (Gyrodactylidae, Monogenea). *Int. J. Parasit.* 32: 907-919.
- HUYSE T., MALMBERG G. 2004: Molecular and morphological comparisons between *Gyrodactylus ostendicus* sp. nov. (Monogenea: Gyrodactylidae) on *Pomatoschistus microps* (Kroyer) and *G. harengi* Malmberg, 1957 on *Clupea harengus membras* L. *Syst. Parasitol.* 58: 105-113.
- KRITSKY D.C., THATCHER V.E. 1977: *Phanerothecium* gen. nov. and *Fundulotrema* gen. nov. Two new genera of viviparous Monogenoidea (Gyrodactylidae), with a description of *P. caballeroi* sp. nov. and a key to the subfamilies and genera of the family. *Exerta Parasitologica en memoria del doctor Eduardo Caballero y Caballero, Instituto de Biologie (Mexico). Publicaciones Especiales.* 4: 53-60.
- KRITSKY D.C., VIANNA R.T., BOEGER A. 2007: Neotropical Monogenoidea. 50. Oviparous gyrodactylids from loricariid and pimelodid catfishes in Brazil, with the proposal of *Phanerothecioides* n. g., *Onychogyrodactylus* n. g. and

- Aglaiogyrodactylus* n. g. (Polyonchoinea: Gyrodactylidea). Syst. Parasitol. 66: 1-34.
- KUUSELA J., ZIĘTARA M.S., LUMME J. 2008: Description of three new European cryptic species of *Gyrodactylus* Nordmann, 1832 supported by nuclear and mitochondrial phylogenetic characterization. Acta Parasitol. 53: 120-126.
- LATRUBESSE E.M., STEVAUX J.C., SANTOS M.D., ASSINE M.L. 2005: Grandes sistemas fluviais: geologia, geomorfologia e paleohidrologia. Quaternário no Brasil (CRG Souza, K. Suguio, AMS Oliveira & PE Oliveira, eds.). Editora Holos, Ribeirão Preto. 276-297.
- LEBLANC J., HANSEN H., BURT M., CONE D. 2006: *Gyrodactylus neilli* n. sp. (Monogenea: Gyrodactylidae), a parasite of chain pickerel *Esox niger* Lesueur (Esocidae) from freshwaters of New Brunswick, Canada. Syst. Parasitol. 65: 43-48.
- MALMBERG G. 1970: The excretory systems and the marginal hooks as a basis for the systematic of *Gyrodactylus* (Trematoda, Monogenea). Arkiv Zool. 23: 1-235.
- MALMBERG G., COLLINS C.M., CUNNINGHAM C.O., JALALI B.J. 2007: *Gyrodactylus derjavinoides* sp. nov. (Monogenea, Platyhelminthes) on *Salmo trutta trutta* L. and *G. derjavini* Mikailov, 1975 on *S. t. caspius* Kessler, two different species of *Gyrodactylus*. combined morphological and molecular investigations. Acta Parasitol. 52: 89-103.
- MATĚJUSOVÁ I., GELNAR M., MCBEATH A.J.A., COLLINS C.M., CUNNINGHAM C.O. 2001: Molecular markers for gyrodactylids (Gyrodactylidae: Monogenea) from five fish families (Teleostei). Int. J. Parasit. 31: 738-745.
- MEINILÄ M., KUUSELA J., ZIĘTARA M.S., LUMME J. 2002: Primers for amplifying, 820 bp of highly polymorphic mitochondrial COI gene of *Gyrodactylus salaris*. Hereditas, 137: 72-74.
- MEINILÄ M., KUUSELA J., ZIĘTARA M.S., LUMME J. 2004: Initial steps of speciation by geographic isolation and host switch in salmonid pathogen *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae). Int. J. Parasitol. 34: 515-526.
- PALADINI G., HUYSE T., SHINN A.P. 2011: *Gyrodactylus salinae* n. sp. (Platyhelminthes: Monogenea) infecting the south European toothcarp *Aphanius fasciatus* (Valenciennes) (Teleostei, Cyprinodontidae) from a hypersaline environment in Italy. Parasit Vectors. 4: 100.

- PIAGGIO A.J., SPICER G.S. 2001: Molecular phylogeny of the chipmunks inferred from mitochondrial cytochrome b and cytochrome oxidase II gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 20: 335-350.
- POUYAUD L., DESMARAIS E., DEVENEY M., PARISELLE A. 2006: Phylogenetic relationships among monogenean gill parasites (Dactylogyridea, Ancyrocephalidae) infesting tilapiine hosts (Cichlidae): systematic and evolutionary implications. *Mol. Phylogenet. Evol.* 38: 241-249.
- PRUESS K.P., ADAMS B.J., PARSONS T.J., ZHU X., POWERS T.O. 2000: Utility of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene for resolving relationships among black flies (Diptera: Simuliidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 16: 286-295.
- RAWSON P.D., BURTON R.S. 2006: Molecular evolution at the cytochrome oxidase subunit 2 gene among divergent populations of the intertidal copepod, *Tigriopus californicus*. *J. Mol. Evol.* 62: 753-764.
- REIS R.E., KULLANDER S.O., FERRARIS C.J. 2003: Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs.
- SANTOS G.M., FERREIRA E.J.G. 1999: Peixes da bacia amazônica. In Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais (R.H. Lowe-McConnell). Edusp, São Paulo. 345-373.
- SCHAEFER S.A. 1998: Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae) Pp. 375- 400. In: Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena (Eds.). Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Porto Alegre, Edipucrs. 603.
- SHINN A.P., HANSEN H., OLSTAD K., BACHMANN L., BAKKE T.A. 2004: The use of morphometric characters to discriminate specimens of laboratory-reared and wild populations of *Gyrodactylus salaris* and *G. thymalli* (Monogenea). *Folia Parasit.* 51: 239-252.
- SPICER G.S. 1995: Phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome oxidase gene: molecular evolution of the *Drosophila buzzatii* species complex. *J. Mol. Evol.* 41: 749-759.
- TAMURA K., NEI M., KUMAR S. 2004: Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Nat. Acad. Sci. USA.* 101: 11030-11035.

- TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A., KUMAR S. 2013: Mega 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol. Biol. Evolution. 30: 2725-2729.
- VANHOVE M.P.M., TESSENS B., SHOELINCK C., JONDELIUS U., LITTLEWOOD T.J., ARTOIS T., HUYSE T. 2013: Problematic barcoding in flatworms: A case-study on monogeneans and rhabdocoels (Platyhelminthes). ZooKeys. 365: 355-379.
- VIGNON M., SASAL P. 2010: The use of geometric morphometrics in understanding shape variability of sclerotized haptor structures of monogeneans (Platyhelminthes) with insights into biogeographic variability. Parasitol. Int. 59: 183-191.
- ZIETARA M.S., LUMME J. 2002: Speciation by host switch and adaptive radiation in a fish parasite genus *Gyrodactylus* (Monogenea, Gyrodactylidae). Evolution. 56: 2445-2458.
- ZIETARA M.S., HUYSE T., LUMME J., VOLCKAERT F.A. 2002: Deep divergence among subgenera of *Gyrodactylus* inferred from rDNA ITS region. Parasitology. 124: 39-52.

Table 4. Genetic distances between paired oviparous Gyrodactylidae species, based on rDNA fragment *ITS*. The number of base by substitutions sites of sequences. Analyses were conducted using the model of Maximum Composite Likelihood (Tamura et al. 2004). All ambiguous positions were removed for each pair of sequences.

ITS	<i>A. cone</i>	<i>A. ctenistus</i>	<i>A. forficulatus</i>	<i>A. forficuloides</i>	<i>A. guttus</i>	<i>A. pedunculatus</i>	<i>A. sp.n.2</i>	<i>O. sudis</i>	<i>O. hydaticus</i>	<i>A. sp.n.6</i>	<i>A. sp.n.4</i>	<i>P. sp.n.1</i>	<i>P. sp.n.2</i>	<i>P. sp.n.3</i>	<i>P. sp.n.4</i>	<i>P. sp.n.5</i>
<i>A. cone</i>	0.0%															
<i>A. ctenistus</i>	2.4 - 3.2%	0.0 - 0.5%														
<i>A. forficulatus</i>	23.0 - 23.8%	22.8 - 24.8%	0.1 - 1.2%													
<i>A. forficuloides</i>	22.7 - 24.7%	22.3 - 24.4%	1.5 - 2.5%	0.0 - 1.5%												
<i>A. guttus</i>	25.6 - 25.8%	25.0 - 27.6%	21.1 - 22.0%	21.2 - 23.9%	0.0%											
<i>A. pedunculatus</i>	24.5%	22.5 - 24.3%	22.5 - 23.2%	22.5 - 23.9%	26.2 - 26.7%	0.0%										
<i>A. sp.n.2</i>	26.2 - 28.2%	24.6 - 27.9%	25.3 - 27.6%	24.4 - 28.9%	28.1 - 30.5%	26.0 - 28.0%	0.0 - 0.1%									
<i>O. sudis</i>	33.2 - 35.7%	31.8 - 36.3%	29.7 - 33.9%	29.8 - 33.2%	33.5 - 36.0%	32.1 - 34.2%	34.1 - 36.7%	0.0 - 1.3%								
<i>O. hydaticus</i>	32.3 - 37.8%	31.8 - 38.2%	31.1 - 36.0%	31.7 - 37.3%	36.2 - 43.2%	34.5 - 37.0%	30.4 - 37.5%	34.7 - 38.3%	0.0 - 17.8%							
<i>A. sp.n.6</i>	7.8%	8.2 - 8.7%	22.6 - 22.8%	22.0 - 23.7%	24.8 - 24.9%	27.1%	28.4 - 30.6%	32.2 - 34.6%	33.0 - 38.2%	0.0%						
<i>A. sp.n.4</i>	13.5 - 14.9%	12.7 - 14.6%	19.5 - 22.6%	19.5 - 23.2%	22.8 - 26.9%	21.6 - 23.7%	23.1 - 28.1%	27.7 - 31.8%	29.4 - 36.2%	14.5 - 16.1%	0.0 - 0.3%					
<i>P. sp.n.1</i>	33.5 - 34.3%	31.5 - 36.4%	32.8 - 35.2%	32.2 - 34.2%	34.8 - 35.4%	33.2 - 34.1%	34.9 - 37.2%	7.2 - 9.4%	35.0 - 38.3%	32.6 - 32.8%	29.5 - 30.8%	0.0 - 0.3%				
<i>P. sp.n.2</i>	32.2 - 39.2%	30.3 - 39.4%	29.2 - 38.8%	29.0 - 38.6%	33.7 - 42.5%	28.4 - 34.6%	33.0 - 40.4%	4.5 - 10.9%	33.5 - 40.9%	31.2 - 38.4%	27.7 - 33.9%	6.6 - 12.3%	0.0%			
<i>P. sp.n.3</i>	30.7%	31.5%	29.7 - 29.8%	28.9 - 29.7%	36.2%	33.0%	31.9%	10.9 - 11.5%	34.7 - 37.8%	28.5%	30.1 - 30.8%	12.5 - 12.8%	7.3%	0.0%		
<i>P. sp.n.4</i>	36.7 - 36.8%	32.1 - 36%	33.9 - 34.6%	33.4 - 34.5%	39 - 39.4%	31.7%	36.8 - 39.9%	8.4 - 9.0%	38.1 - 39.4%	36.5%	30.0 - 31.6%	10.1 - 11.2%	0.2 - 2.9%	7.3%	0.0%	
<i>P. sp.n.5</i>	33.7 - 34.3%	31.7 - 34%	31.0 - 31.7%	30.1 - 31.2%	35.6 - 36.4%	31.8 - 32.5%	34.1 - 36.6%	7.2 - 8.4%	36.0 - 39.9%	33.3 - 33.4%	28.1 - 31.6%	7.8 - 8.6%	6.7 - 12.6%	11.9%	10.5 - 10.7%	0.0%

Table 5. Genetic distances between paired oviparous Gyrodactylidae species, based on mtDNA *COII*. The number of base by substitutions sites of sequences. Analyses were conducted using the model of Maximum Composite Likelihood (Tamura et al. 2004). All ambiguous positions were removed for each pair of sequences.

COII	<i>A. ctenistus</i>	<i>A. forficulatus</i>	<i>A. forficuloides</i>	<i>O. sudis</i>	<i>A. sp.n.4</i>	<i>P. sp.n.2</i>	<i>P. sp.n.3</i>	<i>P. sp.n.4</i>	<i>P. sp.n.5</i>
<i>A. ctenistus</i>	0.0 - 2.0%								
<i>A. forficulatus</i>	37.7 - 45.1%	0.0 - 0.5%							
<i>A. forficuloides</i>	37.2 - 40.9%	15.2 - 18.3%	0.0 - 17.0%						
<i>O. sudis</i>	44.6 - 57.3%	39.5 - 47.1%	40.1 - 53.8%	0.0 - 10.6%					
<i>A. sp.n.4</i>	38.5 - 40.4%	42.0 - 43.4%	44.1 - 45.5%	50.0 - 56.6%	0.0%				
<i>P. sp.n.2</i>	52.5 - 60.6%	53.3 - 62.1%	51.0 - 61.9%	24.4 - 32.1%	59.7 - 61.0%	0.0 - 2.2%			
<i>P. sp.n.3</i>	63.8 - 66.5%	64.5 - 68.9%	66.0 - 68.2%	36.6 - 42.1%	64.2%	38.3 - 39.7%	0.0%		
<i>P. sp.n.4</i>	54.7 - 56.9%	50.5 - 54.9%	46.9 - 53.5%	23.6 - 30.1%	62.0 - 62.7%	10.2 - 12.6%	38.8 - 39.5%	0.0 - 0.3%	
<i>P. sp.n.5</i>	47.3 - 49.0%	50.6 - 50.7%	47.7 - 54.4%	21.6 - 26.1%	57.3%	27.9 - 32.5%	37.1%	31.0 - 31.7%	0.0%

Table 6. Genetic distances between paired viviparous Gyrodactylidae species, based on rDNA fragment *ITS*. The number of base by substitutions sites of sequences. Analyses were conducted using the model of Maximum Composite Likelihood (Tamura et al. 2004). All ambiguous positions were removed for each pair of sequences.

ITS	<i>Gyrodactylus</i> sp.n.4	<i>Gyrodactylus</i> sp.n.5	<i>Gyrodactylus</i> sp.n.8
<i>Gyrodactylus</i> sp.n.4	0.0%		
<i>Gyrodactylus</i> sp.n.5	39.3%	0.0%	
<i>Gyrodactylus</i> sp.n.8	39.3%	0.0%	0.0%

Table 7. Genetic distances between paired viviparous Gyrodactylidae species, based on mtDNA *COII*. The number of base by substitutions sites of sequences. Analyses were conducted using the model of Maximum Composite Likelihood (Tamura et al. 2004). All ambiguous positions were removed for each pair of sequences.

COII	<i>G. scleromystaci</i>	<i>Gyrodactylus</i> sp.n.5	<i>Gyrodactylus</i> sp.n.8
<i>G. scleromystaci</i>	0.0 - 11.7%		
<i>Gyrodactylus</i> sp.n.5	30.6 - 34.2%	0.6%	
<i>Gyrodactylus</i> sp.n.8	30.6 - 36.6%	0.2 - 11.6%	0.4 - 11.4%

CAPÍTULO II

The Stockholm Paradigm: Phylogeny and Ecology Illuminate the Evolution of *Aglaiogyrodactylus* (Gyrodactylidae, Monogenoidea)

Abstract: The Stockholm paradigm explain how specialists can host switching easily and how generalists can evolve from specialists. The transition from specialist to generalist allows host range expansion based on pre-existing genetic variation. Theses is possible because the fitness space is by its nature “sloppy”. Our study system is a clade of seven species forming part of the oviparous *Aglaiogyrodactylus* of a small clade of gyrodactylids inhabiting loricariid catfishes in a stream on the coast of Paraná, Brazil. Were recorded data about host range and abundance, combined with high species richness, broad geographic distribution and specialized make the Gyrodactylidae an excellent model system for studies of the Stockholm Paradigm. The *Aglaiogyrodactylus* spp. exhibit two patterns of host range. Phylogenetic optimization suggests three species ancestral host. All host species were continuously exposed to the different species of *Aglaiogyrodactylus*. Three of the *Aglaiogyrodactylus* species occur on two hosts, three on three hosts, and one on five hosts, indicating variation in compatibility. When added data about the abundance of particular parasite species among compatible hosts, we add information about compatibility. The compatibility and opportunity were more important than conflict resolution in establishing new host-parasite. The relative ability for the host-parasite association to exist is determines by evolutions, the changes in host resource and the size of the parasite’s fitness space, which delimits the extent of resource use. In this case, all parasites are continuously transmitting between host species, indicating that the system associations were influenced strongly by compatibility and parasite “preference”.

Keywords: Stockholm paradigm, Host-parasite association, Ecological fitting, Gyrodactylidae

(*) Capítulo formatado de acordo com as normas de publicação da revista *International Journal for Parasitology*.

1. Introduction

The *Parasite Paradox* (Agosta et al., 2010) is based on a combination of ecological and phylogenetic observations. Parasites are ecological specialists and yet (a) specialists and generalists do not occur equally, specialists predominating while generalists are rare; (b) many emerging diseases occur more rapidly than expected by the chance origin of evolutionary novelties associated with host-use capabilities; and (c) phylogenetic comparisons routinely show high levels of host-switching in the (co)evolutionary diversification of inter-specific associations. The Stockholm Paradigm (Brooks et al., 2014; Hoberg and Brooks, 2015; Araujo et al., 2015) is proposed as a conceptual foundation for parasite paradox, explaining how specialists can host switching easily and how generalists can evolve from specialists.

Empirical studies indicate that host range expands and contracts within clades on macroevolutionary time scales. This is the **Oscillation Hypothesis** (Janz and Nylin, 2008). The hypothesis indicate that not only do specialists evolve from generalists, long postulated to be the case, but new generalists evolve from older specialists. Thus, ecological specialization appears not to be a dead end evolutionarily, and new specialists need not necessarily be recruited from novel generalist lineages following extinction of specialists.

The primary mechanisms permitting the transition from specialist to generalist is **Ecological Fitting** (Janzen, 1985), which allows host range expansion based on pre-existing genetic variation. Phylogenetic conservatism in host resource evolution coupled with widespread geographic distribution of species having those host resources produces geographic mosaics of uninfected, yet susceptible, hosts. The phenomena called “parasite spillover” (Cleaveland et al., 2002; Prenter et al., 2004) and “parasite spillback” (Kelly et al., 2009) are good examples of ecological fitting. Host range expansion through ecological fitting may be enhanced in proportion to the amount of phenotypic plasticity inherent in a given parasite species (Agosta et al., 2010; Janz, 2011), and even parasites with complex (multi-host) life cycles are capable of taking advantage of ecological fitting (Brooks et al., 2006; Malcicka et al., 2015).

Agosta (2006) was the first to recognize that ecological fitting requires parasite fitness space to include not only hosts with resources being utilized successfully at a given time, but also those used in the past and those that could be used but are not currently accessible or “apparent” (Feeny, 1976; Courtney, 1985). That is, in keeping

with fundamental Darwinian principles, survival in changing environmental conditions is based on pre-existing variation that, by definition, was less than optimal in the previous environments. Ecological fitting is possible because Darwinian fitness space is by its nature “sloppy” rather than tightly optimized (see also Agosta and Klemens, 2008; Agosta et al., 2010). Sloppy Fitness Space in coevolution links the distinction between realized and fundamental host range to the distinction between fundamental and realized niche space in ecology.

Host range expansion by coevolved specialists is allowed by ecological fitting; this leads to the emergence of new generalists as a result of specialists exploring sloppy fitness space; those generalists produce new specialists as a result of local coevolutionary interactions. This is the basic dynamic module of the **Stockholm Paradigm**.

This sets the stage for true coevolutionary episodes. Newly produced generalists, occurring in multiple hosts in different geographic areas, may experience localized coevolutionary responses that produce new true specialists and faux generalists, according to the **Geographic Mosaic Theory of Coevolution** (Thompson, 2005). The localized coevolutionary responses may, but need not, include the evolution of defense and counter-defense traits, so the Geographic Theory of Coevolution subsumes classic Coevolutionary Arms Race and Resource Tracking models (Thompson, 2005; Agosta et al., 2010; Janz, 2011).

Repeated through time, the basic dynamic module produces the macroevolutionary oscillations first documented by Janz and Nylin (2008). Major climatological and geological perturbations comprise one means of catalyzing such episodes. According to the **Taxon Pulse** hypothesis (Erwin, 1979; 1981; 1985), biotic diversification occurs through alternating episodes of biotic isolation and expansion, with occasional evolution of novel ecological traits in isolation, leading to (1) general biogeographic patterns resulting from both isolation and expansion, (2) reticulated area relationships, (3) clade-specific patterns of isolation and expansion, and (4) phylogenetic conservatism in niche components relevant to transmission dynamics and microhabitat preference (see Brooks and McLennan, 2002 for extensive documentation of niche conservatism; for a recent update, see Wiens et al., 2010). Empirical studies examined in light of the taxon pulse hypothesis have found clear support for it (Spironello and Brooks, 2003; Bouchard and Brooks, 2004; Bouchard et

al., 2004; Halas et al., 2005; Lim, 2008; Eckstutt et al., 2011). As well, the published literature of the past decade contains multiple studies reporting alternating episodes of dispersal and isolation, without explicitly invoking the taxon pulse. Hoberg and Brooks (2008; 2010; 2013) summarized evidence that climate change and other geographic/geologic events are capable of catalyzing the dynamics encompassed in the dynamic module of the Stockholm Paradigm, producing complex geographic mosaics of specialized host-parasite systems having vast potential for disease emergence. This led Brooks and Ferrao (2005) to characterize the world as a minefield of evolutionary accidents (emerging infectious diseases) waiting to happen.

The Gyrodactylidae encompasses more than 500 nominal species found worldwide living on the integument of teleost fishes, some amphibians, and even mollusks (Boeger et al., 2003). Features of the reproductive biology and transmission dynamics of gyrodactylids form the basis for theories about their high species richness and wide geographic distribution and high degree of endemism. Like most Monogenoidea, gyrodactylids are monoxenous (lacking intermediate hosts or vectors); however, unlike most monogenoids, the majority of gyrodactylids are viviparous, many exhibiting polyembryony (Boeger et al., 2003). Direct and continuous transmission of propagules potentially capable of establishing a viable population in a single generation has led to suggestions of high rates of speciation in different populations of the same host species (sister species occurring on the same host species) and by host switching (non-sister species on the same host species) (Boeger et al., 2003; Boeger et al., 2005).

Phylogenetic analysis indicate that oviparous gyrodactylids are the basal members of the family, reinforcing outgroup-based assessments that viviparity is an evolutionary innovation that arose within the group (Boeger et al., 1994). At present, there are fewer oviparous than viviparous nominal species of gyrodactylids, and those are known only from South American catfishes (Siluriformes) in the Loricariidae. According to Boeger et al. (2003) these fish exhibit hard surfaces that is ideal for deposition of the eggs. This putative reduced diversity and restricted host and geographic range, relative to viviparous members of the family, reinforces theories that viviparity was an evolutionary innovation responsible for high diversification rates in the group (Brooks and McLennan, 1993; Boeger et al., 1994).

The combination of high species richness, broad geographic distribution and host range, and specialized but phylogenetically conservative reproductive modes and life history traits all make the Gyrodactylidae an excellent model system for studies of the Stockholm Paradigm. Our study system is a clade of seven species forming part of the oviparous *Aglaiogyrodactylus* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007.

We presented the case of a small clade of monogenoids inhabiting loricariid catfishes in a stream on the coast of Paraná, Brazil. In the process of collecting specimens for a molecular phylogenetic analysis of the parasites, data about host range and abundance were also recorded. These data represent a snapshot of real ecological structure. The aim of this study is apply the precepts of the Stockholm Paradigm using the host-parasite system focused on *Aglaiogyrodactylus* species and their hosts in this stretch of the Marumbi river. When viewed in a phylogenetic framework, they add breadth to studies investigating the Stockholm Paradigm.

2. Material and Methods

Host fish were caught in a small stream in the Marumbi River of Paraná state (25°30'32.8"S, 48° 52' 31.3"W). The fish hosts were captured with electronarcosis equipment (electrofishing) following the standard methodology. Hosts were immediately placed individually in plastic containers and anaesthetized with benzocaine and subsequently euthanized with section of medulla. After this procedure, the fish and parasites sampled for molecular procedures were fixed in 95% ethanol, and the ones sampled for morphological procedures were fixed in 5% formalin.

In the laboratory, muscle tissue samples of hosts were fixed in hypersaturated saline DMSO solution (Seutin et al., 1991) and the parasites were collected from the sediment using a small probe under a dissecting microscope. Some specimens fixed in 5% formalin were stained with Gomori's trichrome and mounted in Canada balsam (Humason, 1979). Other specimens were cleared and mounted in Hoyer's (Humason, 1979), for the analysis of sclerotized structures. The morphological study was performed with the aid of a microscope with phase contrast and/or DIC (Olympus BX 51) and a digital camera (Olympus QColor 5). Voucher specimens were deposited in the Helminthological Collection of the Instituto Oswaldo Cruz. Abundance of each species of Gyrodactylidae was established following Bush et al. (1997).

The total DNA of parasites fixed in 95% ethanol was extracted using DNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) adapted to monogenoids. For each parasite extracted, one testimony slide was confectioned with the haptor (posterior party of the body) and/or the anterior portion containing the copulatory organ were mounted in Hoyer's medium and used in the identification of the species. The total DNA of host species was extracted using EZ-DNA kit (Biosystems, Brazil).

For the parasites, the primers 18S7f (5'-GCCCTATCAACTTACGATGGTA-3') and 18SF (5'-CCAGCTTGATCCTTCTGCAGGTTCACCTAC-3'), of Littlewood and Bray (2001) were used to amplify and sequence partial fragments from 18S rDNA. The polymerase chain reaction (PCR) was performed with the following program: initial denaturation at 95 °C for 5 min followed by 40 cycles as follows: denaturation at 95 °C for 45 sec, annealing at 55 °C for 1 min, extension at 72 °C for 1 min, and final extension 72 °C for 5 min. PCR was achieved in 25 µl containing 20 – 40 ng of template DNA, 3 mM MgCl₂, 1× PCR –Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0.5 pmoles of each primer, 0.4 mM dNTP, and 1U Platinum Taq polymerase (Invitrogen) in a total volume of 25 µl. Confirmation of the amplification of the fragments by PCR was achieved through electrophoresis in a 1.5% agarose gel, subsequent staining in ethidium bromide and visualization under UV light.

For the hosts, the amplification of DNA was performed with three markers, mitochondrial cytochrome oxidase gene b (CYT b), cytochrome oxidase I (COI) and nuclear gene encoding proteins Rhodopsin (HR) (Table 1). The polymerase chain reaction (PCR) was optimized with the following program: initial denaturation at 95 °C for 4 min, followed by 35 cycles as follows: denaturation at 95 °C for 45 sec, annealing at different temperatures for 45 sec (Table 1), extension at 72 °C for 45 sec, and final extension 72 °C for 5 min. PCR was achieved in 25 µl containing 50 ng of template DNA, 3 mM MgCl₂, 1× PCR–Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0.5 pmoles of each primer, 0.4 mM dNTP, and 1U Taq polymerase (Invitrogen) in a total volume of 25 µl.

Table 1. List of markers with its sequences and annealing temperatures (T) used for amplification of the hosts for each gene tested in this study.

	Hosts	Marker sequence 5'-3'	T (°C)	Reference
Cyt-b	Gludg.l	TGACCTGAARAACCAAYCGTTG	50	Palumbi, 1996
	H16460	CGAYCTTCGGATTACAAGACCG		Palumbi, 1996
COI	FF2d	TTCTCCACCAACCACAARGAYATYGG	58	Ivanova et al., 2007
	FR1d	CACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA		Ivanova et al., 2007
RH	RHPco1F	CATCGTCCGGAGTCCTTATG	50	Chen et al., 2003
	RH1039R	TGCTTGTTTCATGCAGATGTAGA		Chen et al., 2003

Amplified products were purified with the MinElute kit (Qiagen). The sequencing reactions were analyzed in an automatic sequencer, ABI 3130 (Applied Biosystems). Sequences were edited using BioEdit v.7.0.9 (Hall, 1999) and Geneious v.4.5 (created by Biomatters; available from <http://www.geneious.com/>, Drummond et al., 2011).

Final alignment of the parasite sequences was obtained with MAFFT (Kato et al., 2002), available on the GUIDANCE server (<http://guidance.tau.ac.il/>; Penn et al., 2010), used to guide the removal of parts of alignment that showed low reliability. Host sequences were aligned in Translation Alignment using Geneious v. R6 (Kearse et al., 2012). Both phylogenetic analysis were obtained using MrBayes v3.1.1 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) in the platform Cipres (Miller et al., 2015) using 2 run, 4 chains, 20 million generations, burnin of 100.000 and with GTR+i+gamma as initial model, for the parasite alignment, and GTR+G+I for the host alignments. The choice of the outgroup species was based on their phylogenetic relationships relative to the Gyrodactylidae (Boeger and Kritsky, 1993, 2001; Olson and Littlewood, 2002). The phylogenetic relationships of the host species used 14 species, including species of Characiformes and Siluriformes as outgroups (see Table 2 for voucher and Genbank accession numbers). Recent phylogenetic analysis of Loricariidae species by Lujan et al. (2015) was also utilized as an alternative hypothesis of host relationships. Phylogenetic changes in host range of *Aglaogyrodactylus* spp. were inferred using the biogeographic protocol proposed by Lieberman (2000, 2003a,b).

Table 2. Lists of host species ingroups and outgroup, with family information, voucher and identification in Genbank.

Characiformes (outgroup)	Family	VOUCHER	GENBANK
<i>Astyanax ribeirae</i> Eigenmann, 1911	Characidae	COM65	
Synbranchiformes (outgroup)			
<i>Synbranchus marmoratus</i> Bloch, 1795	Synbranchidae		AY355092
Siluriformes (outgroup)			
<i>Acentronichthys leptos</i> Eigenmann et Eigenmann, 1889	Heptapteridae	COM28	
<i>Pimelodella chagresi</i> (Steindachner, 1877)	Pimelodidae		DQ119466
<i>Pimelodella pappenheimi</i> Ahl, 1925	Pimelodidae	COM09	
<i>Rhamdioglanis frenatus</i> Ihering, 1907	Heptapteridae	COM19	
<i>Rhamdioglanis transfasciatus</i> Miranda Ribeiro, 1908	Heptapteridae	COM429	
<i>Scleromystax barbatus</i> (Quoy et Gaimard, 1824)	Callichthyidae		GU209687
Siluriformes (ingroup)			
<i>Ancistrus multispinis</i> (Regan, 1912)	Loricariidae	COM204	
<i>Hisonotus leucofrenatus</i> (Miranda Ribeiro, 1908)	Loricariidae	COM132	
<i>Kronichthys lacerta</i> (Nichols, 1919)	Loricariidae	COM195	
<i>Pareiorhaphis splendens</i> (Bizerril, 1995)	Loricariidae	COM38	
<i>Rineloricaria</i> sp.	Loricariidae	COM179	
<i>Schizolecis guntheri</i> (Miranda Ribeiro, 1918)	Loricariidae	COM160	

Table 3. Lists of parasites species ingroup and outgroup, with family information, voucher and identification in Genbank.

Capsalidae (outgroup)	VOUCHER	GENBANK
<i>Benedenia</i> sp.		AJ228774
<i>Encotyllabe chironemi</i> Robinson, 1961		AJ228780
Udonellidae (outgroup)		
<i>Udonella caligorum</i>		FJ946831
Viviparous Gyrodactylidae (outgroup)		
<i>Gyrodactylus</i> sp.		JX840355
Oviparous Gyrodactylidae (ingroup)		
<i>Aglaigyrodactylus</i> sp.n.4	CAC-LOR02-1-14	
<i>Aglaigyrodactylus calamus</i> Kritsky, Vianna et Boeger, 2007	COM72-1-1	
<i>Aglaigyrodactylus coneï</i> Kritsky, Vianna et Boeger, 2007	AÇU-LOR07-1-5	
<i>Aglaigyrodactylus ctenistus</i> Kritsky, Vianna et Boeger, 2007	NHU-LOR01-1-6	
<i>Aglaigyrodactylus forficulatus</i> Kritsky, Vianna et Boeger, 2007	G335-1-1	
<i>Aglaigyrodactylus forficuloides</i> Kritsky, Vianna et Boeger, 2007	NHU-LOR04-1-4	
<i>Aglaigyrodactylus guttus</i> Kritsky, Vianna et Boeger, 2007	GUA-LOR04-1-3	
<i>Aglaigyrodactylus salebrosus</i> Kritsky, Vianna et Boeger, 2007	GYRO885-1-7	
<i>Aglaigyrodactylus pedunculatus</i> Kritsky, Vianna et Boeger, 2007	CAC-LOR28-1-7	
<i>Onychogyrodactylus hydaticus</i> Kritsky, Vianna et Boeger, 2007	COM203-1-26	

3. Results

Phylogenetic analysis of the members of this clade of *Aglaiogyrodactylus* spp. (Fig. 1) has generally high support; all branches have posterior probability values greater than 80%. Our analysis indicates that *Onychogyrodactylus hydaticus* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007 is a member of *Aglaiogyrodactylus*.

The Loricariidae species that host *Aglaiogyrodactylus* spp. in the Marumbi river were: *Ancistrus multispinis* (Regan, 1912) (A), *Hisonotus leucofrenatus* (Miranda Ribeiro, 1908) (H), *Pareiorhaphis splendens* (Bizerril, 1995) (Ps), *Kronichthys lacerta* (Nichols, 1919) (K), *Rineloricaria* sp. (R) and *Schizolecis guntheri* (Miranda Ribeiro, 1918) (S). The relative phylogenetic relationships for these species; high posterior probability values, most maximum, were showed in Fig. 1, this analysis indicate that this reconstruction, though incomplete, is highly robust. A second phylogeny with the relative position of each host species was produced using data proposed by Lujan et al. (2015) were showed in Fig. 2. Both figures present the observed parasites and their respective host ranges, indicated by their respective abundances.

3.1. Ecology from the Parasite Perspective

The combined information on the phylogenetic relationships of the parasites, relative phylogenetic information on the hosts, and abundance of each parasite species on each host species examined in this study were in Fig. 1.

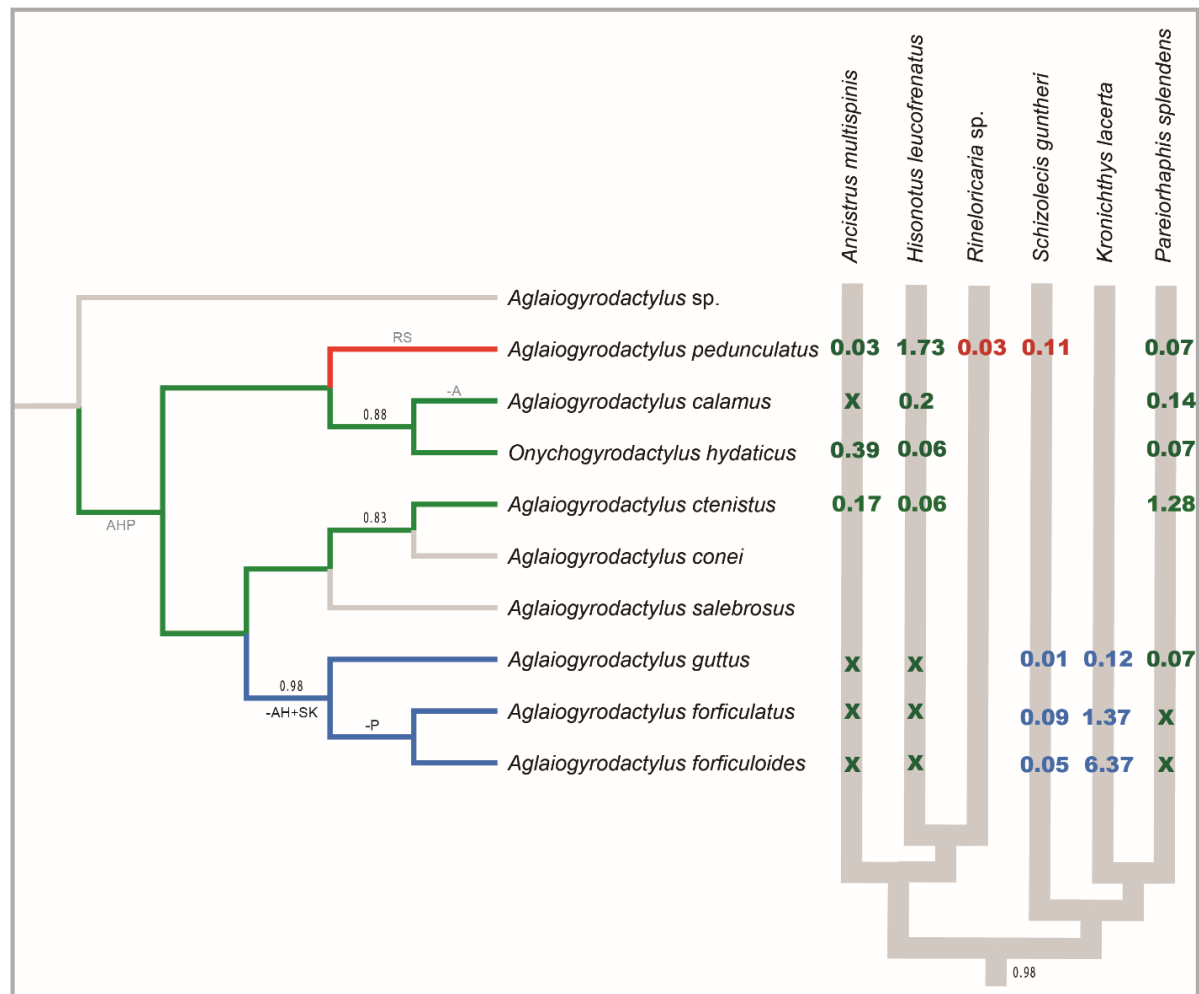


Fig. 1. Phylogenetic and ecological data for *Aglaiogyrodactylus* spp. inhabiting 6 species of loricariid catfishes in the Marumbi River: *Ancistrus multispinis* (A), *H. leucofrenatus* (H), *Rineloricaria* sp. (R), *S. guntheri* (S), *K. lacerta* (K) and *P. splendens* (P). The phylogenetic relationships of the clade of *Aglaiogyrodactylus* spp. (left) is presented with the phylogeny of their hosts (right), and the observed abundance (histogram) of each parasite species on each host species is presented on the intersection of both phylogenies. Posterior probability values are present by each branch except when equal to 1. Host range evolution is optimized over the parasite tree – colored branch indicate distinct host-range compositions. *Aglaiogyrodactylus coneii* and *A. salebrosus*, that do not occur in that river were included in the analysis to provide a complete evolutionary context.

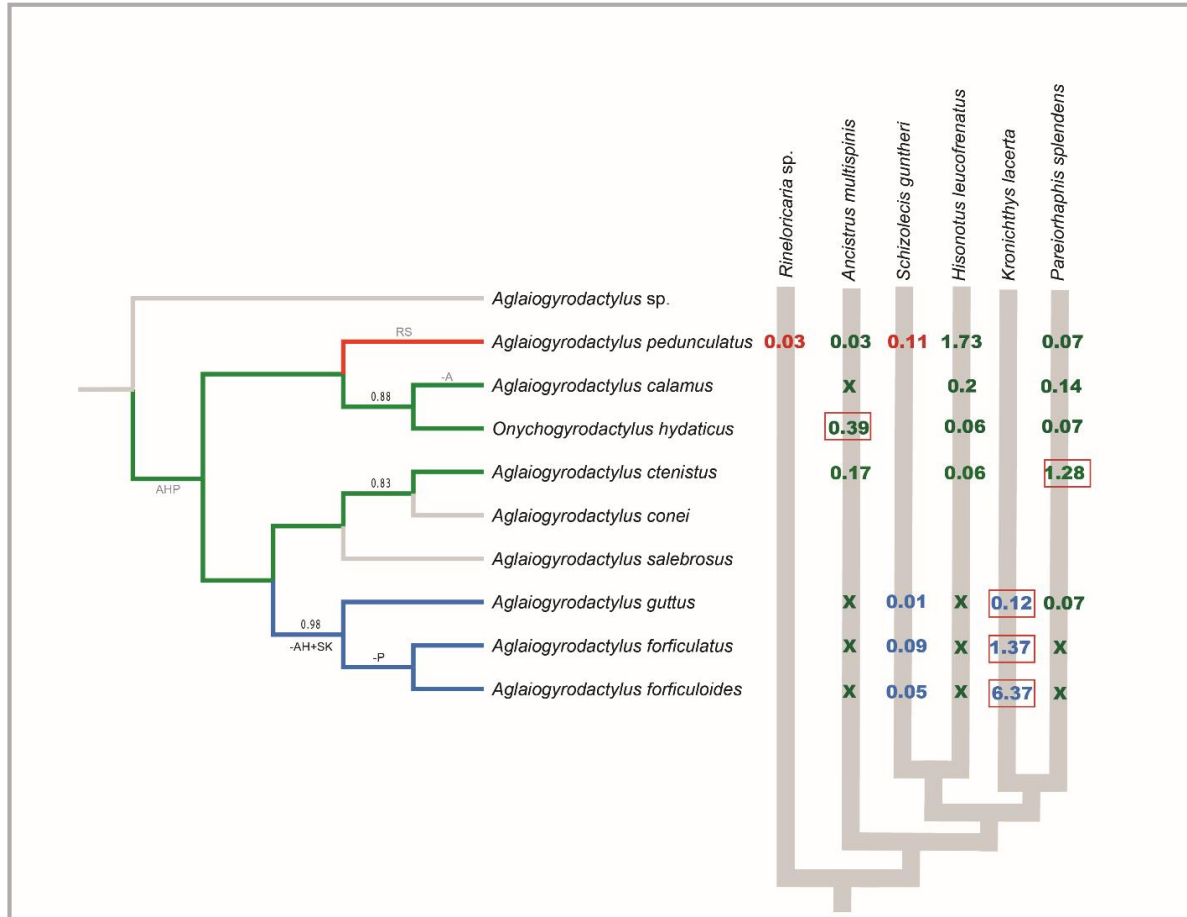


Fig. 2. Phylogenetic and ecological data for *Aglaiogyrodactylus* spp. inhabiting 6 species of loricariid catfishes in the Marumbi River: *Rineloricaria* sp. (R), *Ancistrus multispinis* (A), *S. guntheri* (S), *H. leucofrenatus* (H), *K. lacerta* (K) and *P. splendens* (P). The phylogenetic relationships of the clade of *Aglaiogyrodactylus* spp. (left) is presented with the phylogeny of their hosts proposed by Lujan et al. (2015) (right), and the observed abundance (histogram) of each parasite species on each host species is presented on the intersection of both phylogenies. Posterior probability values are present by each branch except when equal to 1. Host range evolution is optimized over the parasite tree – colored branch indicate distinct host-range compositions. *Aglaiogyrodactylus coneii* and *A. salebrosus*, that do not occur in that river were included in the analysis to provide a complete evolutionary context.

3.2. Host Context of Parasite Speciation

Aglaiogyrodactylus spp. at this locality exhibit two patterns of host range. The first includes *A. pedunculatus*, *A. calamus* s, *O. hydaticus* and *A. ctenistus*. Only the first three species form a clade, and all four are related to each other only at the level of the basal node in the phylogeny. Yet they all parasitize *H. leucofrenatus* and *P. splendens*, and all but not *A. calamus* parasitize *A. multispinis*. *Aglaiogyrodactylus pedunculatus* also infects *Rineloricaria* sp. and *S. guntheri*. The second includes the clade of *A. guttus*, *A. forficulatus* and *A. forficuloides*. All three members of this group parasitize *S. guntheri* and *K. lacerta*. The oldest member, *A. guttus*, also parasitizes *P.*

splendens, a host also shared by *A. pedunculatus*, *A. calamus*, *O. hydaticus* and *A. ctenistus*.

Phylogenetic optimization of the observed host range data (Fig. 1, 2) suggests an ancestral host range of *A. multispinis* + *H. leucofrenatus* + *P. splendens*. Those host species are relatively closely related to each other, especially the first two species, but do not form a clade, being connected with each other phylogenetically only at the base on the tree. This implies that whatever they have in common relative to hosting *Aglaogyrodactylus* spp. is plesiomorphic for the group (i.e. they “look” similar to the parasite species). This apparent phylogenetic conservatism in host utilization capabilities characterizes *A. pedunculatus*, *A. calamus*, *O. hydaticus* and *A. ctenistus*. Only the first three form a clade, but all four are related to each other at the level of the basal node in the phylogeny, the same point at which the ancestral host range occurs. Both *O. hydaticus* and *A. ctenistus* retain the ancestral host range. *Aglaogyrodactylus calamus* appears to have lost the ancestral association with *A. multispinis*; *A. pedunculatus*, by contrast, has added *Rineloricaria* sp. and *S. guntheri* to the ancestral host range.

The clade composed by *A. guttus*, *A. forficuloides*, and *A. forficulatus*, by contrast, exhibits considerable divergence in host range. Phylogenetic optimization supports an inference of the loss of ability to parasitize the ancestral hosts *A. multispinis* and *H. leucofrenatus* and the addition of new hosts *S. guntheri* and *K. lacerta*. This implies that, at some point during the evolution of the ancestral species of this parasite clade, the host range either 1) expanded by adding *S. guntheri* + *K. lacerta* to *A. multispinis* + *H. leucofrenatus* + *P. splendens*, then reduced to *P. splendens* + *S. guntheri* + *K. lacerta*, the host range exhibited by *A. guttus*, or 2) was altered through the loss of *A. multispinis* and *H. leucofrenatus* and addition of *S. guntheri* and *K. lacerta*. The first interpretation would represent the only evidence of host range oscillation we encountered in this study. The common ancestor of *A. forficulatus* and *A. forficuloides* exhibited a further reduction in host range by losing *P. splendens* in its host range.

Four of the parasite species in this study occurred in abundances higher than 1.0: *A. pedunculatus* (1.73 on *H. leucofrenatus*) and *A. ctenistus* (1.28 on *P. splendens*) from the group maintaining the ancestral host range, and *A. forficulatus* (1.37 on *K. lacerta*) and *A. forficuloides* (6.37 on *K. lacerta*) from the group showing a

major host switch. The remaining three species had a maximum abundance of less than 0.40 but greater than or equal to 0.10 on any host: *A. calamus* (0.14 on *P. splendens* and 0.2 on *H. leucofrenatus*) and *O. hydaticus* (0.39 on *A. multispinis*) from the group maintaining the ancestral host range, and *A. guttus* (0.12 on *K. lacerta*) from the group showing a major host switch.

4. Discussion

The scenario analyzed here represents a cross-section study of the long and short-term dynamics of host-parasite association that is played on a geographic, geologic and climatological background. Under the Stockholm Paradigm, geography, geology and climate promote isolation and expansion of communities and species, hence **opportunity** of contact of actors (host and parasites) in ecological and evolutionary times. The study was performed in a single river system, one of many small hydrographic basins in the region hence, opportunity for the different parasite populations to access the different host species within this stream is maximized but it is minimized when species absent in the stream is considered. The composition of the fish community, and hence of their parasites, in the studied river (Marumbi river) are expectedly strongly influenced by both recent and past geological and climatological events as well as exchanges between neighboring basins.

The phylogenetic inferences about the relationship between host range and parasite speciation must be viewed with caution. The geographic scale of this study may be too small to observe the influence of possible geographic isolation and expansion events (Geographic Mosaic Theory of Coevolution and/or Taxon Pulse dynamics) in the production of new species. In a model demonstrating the ease by which host switching can be initiated through ecological fitting, Araujo et al. (2015) suggested that *compatibility* and opportunity were more important than conflict resolution in establishing new host-parasite associations. Host range tells us something about the compatibility of parasites for various host species in their environments.

Evolution determines the relative ability for the host-parasite association to exist by determining changes in host resource and the size of the parasite's fitness space, which delimits the extent of resource use (host range). In this case, as for all Gyrodactylidae and likely species of related families, parasites are continuously

transmitting between host species and, thus, in this riverine system associations are strongly a matter of compatibility (Araujo et al., 2015) and parasite “preference” (see Boeger et al., 2003). Thus, all host species are continuously exposed to the different species of *Aglaogyrodactylus* identified locally, in the Marumbi river and, thus, we expect that associations detected in this study represent a relatively permanent condition. If an association is relatively prevalent, we suppose, it indicates that the host species represents a resource that may be considered adequate for the parasites species to occupy, i.e. ecological indices may indeed represent proxies of compatibility of the host to the parasite (=fit?). We also expect that the host-parasite associations observed in this spatially and temporally limited sampling are the products of a complex combination of processes including macro- and microevolutionary processes. The combination of variation in host range and little evidence of co-speciation (sister species of parasites in sister species of hosts) observed herein conform to the expectations of the Stockholm Paradigm.

4.1 Host Range and Parasite Abundance: Microevolutionary Influence of the Stockholm Paradigm Dynamic

In this study, three of the *Aglaogyrodactylus* species occur on two hosts, three on three hosts, and one on five hosts, indicating variation in compatibility. When we add data about the *abundance* of particular parasite species among compatible hosts, we add information about *compatibility* (including the constraints of preference) to our explanations. Parasite *abundance* is defined as a combination of *prevalence* (the proportion of infected hosts in a given sample) and *intensity* (the number of parasite individuals on a given host individual) (Bush et al., 1997). Parasite ecologists commonly find that, for cases in which there are multiple hosts for a parasite species, abundance differs among those hosts. In addition, different parasite species inhabiting the same or different host species within an ecosystem often exhibit different abundance. Parenthetically, we note that prevalence and intensity, examined separately, produce the same results as abundance, upon which the following results are based. Although there is no association between host range and maximum abundance in the macroevolutionary context, in all species the highest abundance is found on at least one of the host species with which the parasite species was associated at its origin. This partially supports a commonly-held assumption that

parasites will be most abundant on their original host. This is expected when host range expansion results from ecological fitting. Once a parasite becomes widespread either geographically or among hosts via ecological fitting, new localized specialists may emerge as described by the Geographic Mosaic Theory of Coevolution. If those coevolutionary processes produce new parasite species initially associated with only a single host species, we should then see a shift in abundance away from the original host and in the direction of one of the hosts added as a result of ecological fitting.

As stated above, the ancestral host range for the species analyzed is *A. multispinis* + *H. leucofrenatus* + *P. splendens* (A-H-P). For *A. pedunculatus*, the maximum abundance is on *H. leucofrenatus* (1.73), much higher than on *A. multispinis* (0.03) or *P. splendens* (0.07). The remaining two species in that group of parasites exhibit a different pattern. *Aglaiogyrodactylus calamus* has lost one host (*A. multispinis*) from the ancestral host range, but occurs in low abundances on the remaining hosts (0.2 on *H. leucofrenatus* and 0.14 on *P. splendens*), so the divergence observed in the abundance of each species to their respective host species suggest divergence compatible with the Geographic Mosaic of Coevolution. *Onychogyrodactylus hydaticus* remains associated with all three ancestral host species, but at low abundance on all (0.39 on *A. multispinis*, and 0.06 on *H. leucofrenatus* and 0.07 on *P. splendens*), while *A. calamus* depicts greater abundance on *H. leucofrenatus* and is absent on specimens of *A. multispinis*.

The ancestral host range for the clade comprising *A. ctenistus*, *A. guttus*, *A. forficulatus* and *A. forficuloides* is *P. splendens* + *S. guntheri* + *K. lacerta* (P-S-K), and for the common ancestor of *A. forficuloides* and *A. forficulatus* it is *S. guntheri* + *K. lacerta* (S-K). For *A. ctenistus*, the maximum abundance is on *P. splendens* (1.28), much higher than on *H. leucofrenatus* (0.06) or *A. multispinis* (0.17). This may also indicate divergence resulting from differential response to selection as envisioned by the Geographic Mosaic Theory of Coevolution, especially if each host species has different specialized microhabitat preferences within the study area.

Both *A. forficulatus* and *A. forficuloides* occur in high abundance on *S. guntheri* (0.09 and 0.05, respectively) and in low abundance on *K. lacerta* (1.37 and 6.37, respectively). So again there is no evidence of compensatory change or increase in prevalence that would suggest divergence on one of the remaining hosts. Finally, *A. guttus* retains all of its ancestral hosts, but at low abundance on all (0.12 on *K. lacerta*,

0.07 on *P. splendens* and 0.01 on *S. guntheri*), the abundance in *P. splendens* is similar to *O. hydaticus*.

In this study there are 12 additional host-parasite associations in which *Aglaiogyrodactylus* spp. occurred at abundances of 0.11 or less. For *A. pedunculatus* on *Rineloricaria* sp. (0.03) and *S. guntheri* (0.11), both host species are additions to the ancestral host range, indicating host range expansion by ecological fitting. The remaining 10 hosts with low abundance of *Aglaiogyrodactylus* spp. in this study represent putative ancestral host species for the parasites.

4.2. Ecology from the Host Perspective

Having obtained substantial insights from examining the origins and evolution of some elements of their ecology, we may also ask how this assemblage of parasites appears when examined from the host perspective. That reveals two distinct groupings.

Three host species correspond to "core-satellite" component communities (Hanski, 1982a,b,c), *P. splendens* with five parasite species dominated (greater abundance) by *A. ctenistus*, *H. leucofrenatus* with four parasite species dominated by *A. pedunculatus*, and *K. lacerta* with three parasites species dominated by *A. forficulatus* and *A. forficuloides*. Two of those hosts (*P. splendens* and *H. leucofrenatus*) are ancestral associates of the parasite clade, while one (*K. lacerta*) is the result of host switching. The other three species host communities of rare parasites: *S. guntheri* with four species of parasites ranging in abundance from 0.01-0.11, *A. multispinis* with three parasite species ranging in abundance from 0.03-0.39, and *Rineloricaria* sp. with one parasite species occurring at an abundance of 0.03. There are no evident associations between modes of speciation or evolution of host range that provide a common theme linking each of these two types of component communities. As with assessments of host range and speciation, we must consider the possibility that these hosts harbor more robust parasite communities in other places, so that understanding regularities in the evolution and maintenance of these communities may require a larger spatial and temporal scale.

Final remarks

This study underscores the observation that parasite biodiversity comprises complex mosaics of host relationships and geographic distributions on a variety of spatial and temporal scales (reviewed by Hoberg and Brooks, 2008, 2010, 2013; also Niebering et al., 2005; Ellis et al., 2015; Olsson-Pons et al., 2015). As a result, robust studies of parasite diversity and diversification emerge from integrative studies combining phylogenetic and ecological data (Brooks and McLennan, 1993, 2002). But even that is not enough; such data must be assessed in light of a robust theoretical framework. The Stockholm Paradigm is such a framework. Examining basic phylogenetic and ecological information in light of the Stockholm Paradigm provided direct explanations about this system of monogenoideans and their hosts. That includes recognition of cases in which a larger spatial and/or longer temporal scale may be necessary to more fully explain the data.

Good frameworks also suggest novel ways of interpreting well-established observations. For example, Araujo et al. (2015) suggested that opportunity and compatibility are more important than conflict resolution in establishing new host-parasite associations. In this study, all the observations reported above can be explained in terms of compatibility and opportunity. Araujo et al. (2015) also showed that long-term survival in sub-optimal hosts is quite feasible (see Boeger et al., 2005 and Duffus et al., 2014 for experimental cases). We must therefore not assume that low-abundance parasites have limited evolutionary potential (a notion that could be reinforced by calling them "accidental" or "incidental" infections, or "satellite" community members), or that the numerically dominant species are the repository of the evolutionary future of a parasite group. Sixteen of 20 host-parasite associations in this study exhibit abundances of 0.11 or less, but this does not mean they are irrelevant to the survival or evolutionary diversification of the group. In the cases of *A. calamus*, *O. hydaticus* and *A. guttus*, we may even see evidence of speciation in association with sub-optimal hosts. Today's numerically rare species, accounting for 80% of the host-parasite associations in this study, may become abundant in the future, should environmental stressors, such as climate change and anthropogenic changes, alter the conditions under which abundant species dominate numerically, providing non-abundant species with opportunities to enhance their abundance (Boeger et al., 2003; Boeger et al., 2005). Such species, surrounded by more optimal hosts and awaiting

only a change in conditions to provide the opportunity to switch, would possess substantial potential for host-switching and thus emerging disease because the newly-colonized hosts would not have had the opportunity for resistance to evolve (Hoberg and Brooks, 2015). A cursory examination of recently published studies of parasite abundance patterns across a range of parasites and hosts indicates that most host-parasite associations are low-abundance (e.g., Olsson-Pons et al., 2015; Vhora and Bolek, 2015; Werneck et al., 2015), in agreement with earlier studies (e.g., Canaris and Kinsella, 1998; Morand et al., 1999; Perez-del-Olmo et al., 2011). This may well account for the observation that only 3/6 component communities in this study exhibit core-satellite structure (see Gaston and Lawton, 1989 for discussions of exceptions to core-satellite structure).

Given the complex mosaic of temporal and spatial scaling effects in parasite evolution, however, we must also consider the possibility that these parasites occur in higher abundances on the same or different hosts in other areas (as embodied in both the Geographic Mosaic Theory of Coevolution and the Taxon Pulse). As stated in the introduction, recognizing that fitness space is sloppy is crucial to integrating the seeming paradox that ecological specialization and phylogenetic conservatism in parasites is linked with remarkable evolutionary flexibility and longevity. One way to visualize this is to think of *compatibility* to be equivalent to *fundamental niche space*. That is, the sum total of all members of all host species in all parts of the world that could be compatible hosts for a given parasite species. Then consider *opportunity* to be equivalent to *realized niche space*, those hosts actually harboring the parasite. This means *abundance* is "compatibility limited by opportunity." The difference between compatibility and opportunity, i.e. between fundamental and realized niche space, is thus proportional to the sloppiness of fitness space. In the case of parasites, given their over-dispersed population structure, geographic localization, and their specialized host resource requirements, microhabitat preferences, and transmission dynamics, fitness space should be very sloppy, and indeed this seems to be the case (e.g., Morand et al., 1999). There will always be compatible hosts that are available but not infected and compatible hosts that are not available at a particular time and place, coupled with parasites' great ability to take advantage of them whenever changing conditions present new opportunities. Agosta (2006) thus correctly recognized ecological fitting in sloppy fitness space as the source of the tremendous evolutionary survival skills

exhibited by parasites. Hoberg (1986) provided one of the most startling cases of this when he showed that some cestodes inhabiting marine birds today likely originated in Mesozoic marine archosaurs, and survived the K-T mass extinction event that killed their original hosts by host switching.

If fitness space is sloppy, abundance data must be highly context-dependent, so they should not produce general macroevolutionary patterns. We may only be able to say that a certain species is highly abundant (or rare) at a certain place, in a certain host, at a certain point in time. Such data are not meaningless, however. They may provide crucial information about changes affecting the ecological and evolutionary opportunities available to the parasites resulting from climate change or anthropogenic alterations, if placed in a time-series of repeated sampling efforts and assessed phylogenetically. This is a central tenet of the DAMA protocol (Brooks et al., 2014) proposed to help make studies of emerging diseases more anticipatory and cost-effective than crisis-response.

Finally, if further studies corroborate the findings presented herein, both oviparous and viviparous gyrodactylids exhibit high rates of speciation by host switching and sympatric speciation. As a result, if the evolution of viviparity had a direct influence on diversification in gyrodactylids, it was quantitative rather than qualitative. Other traits correlated with gyrodactylid diversity - being monoxenous, with small body size, living on the exterior of a host, and having high reproductive rates – are all traits shared by oviparous and viviparous gyrodactylids. Perhaps viviparity was the final link in a keychain of innovations (see Brooks and McLennan, 2002 for a discussion of key innovations with references; for recent updates see Givnish, 2015; Sundue et al., 2015) leading to unusually high diversification rates in viviparous gyrodactylids.

References

- Agosta, S.J., 2006. On ecological fitting, plant-insect associations, herbivore host shifts, and host plant selection. *Oikos* 114, 556-565.
- Agosta, S.J., Klemens, J.A., 2008. Ecological fitting by phenotypically flexible genotypes: implications for species associations, community assembly and evolution. *Ecol. Lett.* 11, 1123-1134.

- Agosta, S.J., Jans, N., Brooks, D.R., 2010. How generalists can be specialists: resolving the “parasite paradox” and implications for emerging disease. *Zoologia* 27, 151-162.
- Araujo, S.B.L., Braga, M.P., Brooks, D.R., Agosta, S.J., Hoberg, E.P., Von Hartenthal, F.W., Boeger, W.A., 2015. Understanding Host-Switching by Ecological Fitting. *PloS One* 10, 10, 1-17.
- Boeger, W.A., Kritsky, D.C., 1993. Phylogeny and a revised classification of the Monogenoidea Bychowisky, 1937 (Platyhelminthes). *Syst. Parasitol.*, 26, 1, 1-21.
- Boeger, W.A., Kritsky, D.C., Belmont-Jégu, E., 1994. Neotropical Monogenoidea. 20. Two new species of oviparous Gyrodactylidea (Polyonchoinea) from loricariid catfishes (Siluriformes) in Brazil and the phylogenetic status of Ooegyrodactylidae Harris, 1983. *J. Helminthol. Soc. W.*, 61, 34-44.
- Boeger, W.A., Kritsky, D.C., 2001. Phylogenetic relationships of the Monogenoidea. In D. T. J. Littlewood & R. A. Bray (Eds) *Interrelationships of the Platyhelminthes*, London: Taylor & Francis, 92-102.
- Boeger, W.A., Kritsky, D.C., Pie, M.R., 2003. The context of diversification of the viviparous Gyrodactylidae. *Zool. Scr.*, 32, 5, 437-448.
- Boeger, W.A., Kritsky, D.C., Pie, M.R., Engers, K.B., 2005. Mode of transmission, host switching, and escape from the Red Queen by viviparous gyrodactylids (Monogenoidea). *J. Parasitol.*, 91, 1000-1007.
- Bouchard, P., Brooks, D.R., 2004. Effect of vagility potential on dispersal and speciation in rainforest insects. *J. Evolution. Biol.*, 17, 5, 994-1006.
- Bouchard, P., Brooks, D.R., Yeates, D.K., 2004. Mosaic macroevolution in Australian Wet Tropics arthropods: community assemblage by taxon pulses. *Tropical rainforests: past, present and future*, 425-469.
- Brooks, D.R., McLennan, D.A., 1993. Comparative study of adaptive radiations with an example using parasitic flatworms (Platyhelminthes: Cercomeria). *Amer. Nat.*, 142, 755-778.
- Brooks, D.R., McLennan, D.A., 2002. *The nature of diversity: an evolutionary voyage of discovery*. University of Chicago Press, Chicago. 668.
- Brooks, D.R., Ferrao, A.L., 2005. The historical biogeography of coevolution: emerging infectious diseases are evolutionary accidents waiting to happen. *J. Biogeogr.*, 32, 1291-1299.

- Brooks, D.R., Hoberg, E.P., 2006. Systematics and emerging infectious diseases: from management to solution. *J. Parasitol.*, 92, 426-29.
- Brooks, D.R., León-Règagnon, V., McLennan, D.A., Zelmer, D., 2006. Ecological fitting as a determinant of the community structure of platyhelminth parasites of anurans. *Ecology*, 87, 76-85.
- Brooks, D.R., McLennan, D.A., León-Règagnon, V., Hoberg, E.P., 2006. Phylogeny, ecological fitting and lung flukes: helping solve the problem of emerging infectious diseases. *Rev. Mex. Biodivers.*, 77, 225-233.
- Brooks, D.R., Hoberg, E.P., Boeger, W.A., Gardner, S.L, Galbreath, K.E., Herczeg, D., Hugo, H.M., Rácz, E.S., Dursahinhan, A.T., 2014. Finding Them Before They Find Us: Informatics, Parasites, and Environments in Accelerating Climate Change. *Comp. Parasitol.*, 81, 2, 155-164.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D.L., Lotz, J.M., Shostak, A.W., 1997. Parasitology meets ecology on terms: Margolis et al. Revisited. *J. Parasitol.*, 83, 575-583.
- Canaris, A.G., Kinsella, J.M., 1998. Helminth parasite communities in four species of shorebirds (Charadriidae) on King Island, Tasmania. In *Pap. Proc. R. Soc. Tasmania*, 132, 49-58.
- Chen, W.J., Bonillo, C., Lecointre, G., 2003. Repeatability of clades as a criterion of reliability: a case study for molecular phylogeny of Acanthomorpha (Teleostei) with larger number of taxa. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 26, 262-288.
- Cleaveland, S., Hess, G.R., Dobson, A.P., Laurenson, M.K., McCallum, H.I., Roberts, M.G., Woodroffe, R., 2002. The role of pathogens in biological conservation. In: Hudson PJ, Rizzoli A, Grenfell BT, Heesterbeek H, Dobson AP (eds) *The ecology of wildlife diseases*. Oxford Univ Press, Oxford, 139-150.
- Courtney, S.P., 1985. Apparency in coevolving relationships. *Oikos*, 44, 91-98.
- Drummond, A.J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., Field, M., Heled, J., Kearse, M., Markowitz, S., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, S., Thierer, T., Wilson, A., 2011. Geneious v5.4, Available from <http://www.geneious.com/>.
- Duffus, A.L.J., Nichols, R.A., Garner, T.W.J., 2014. Experimental evidence in support of single host maintenance of a multihost pathogen. *Ecosphere*, 5, 11, 142.
- Eckstutt, M.E., McMahan, C.D., Crother, B.I., Ancheta, J.M., McLennan, D.A., Brooks, D.R., 2011. PACT in Practice: Comparative Historical Biogeographic Patterns and

- Species-Area Relationships of the Greater Antillian and Windward Hawaiian Island Terrestrial Biotas. *Global Ecol. Biogeogr.*, 20, 545-557.
- Ellis, V.A., Collins, M.D., Medeiros, M.C.I., Sari, E.H.R., Coffey, E.D., Dickerson, R.C., Lugarini, C., Stratford, J.A., Henry, D.R., Merrill, L., 2015. Local host specialization, host-switching, and dispersal shape the regional distributions of avian haemosporidian parasites. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 112, 11294-11299.
- Erwin, T.L., 1979. Thoughts on the evolutionary history of ground beetles: hypotheses generated from comparative faunal analyses of lowland forest sites in temperate and tropical regions. *Carabid beetles*, Springer Netherlands. 539-592.
- Erwin, T.L., 1981. Taxon pulses, vicariance, and dispersal: an evolutionary synthesis illustrated by carabid beetles, pp. 159-196. In: *Vicariance Biogeography: A Critique*. (G. Nelson and D.E. Rosen, editors). Columbia University Press. New York. XVI. 593.
- Erwin, T.L., 1985. The taxon pulse: a general pattern of lineage radiation and extinction among carabid beetles. *Taxon. Phyl. Zoog. Beet. Ant.*, 437-488.
- Feeny, P., 1976. Plant apparency and chemical defense. In *Biochem. Int. Bet. Plants and Insects*, 1-40.
- Gaston, K.J., Lawton, J.H., 1989. Insect herbivores on bracken do not support the core-satellite hypothesis. *Am. Nat.*, 761-777.
- Givnish, T.J., 2015. Adaptive radiation versus 'radiation' and 'explosive diversification': why conceptual distinctions are fundamental to understanding evolution. *New Phytologist.*, 207, 2, 297-303.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41, 95-98.
- Halas, D.; Zamparo, D.; Brooks, D.R., 2005. A protocol for studying biotic diversification by taxon pulses. *J. Biogeogr.*, 32, 249-260.
- Hanski, I., 1982a. Dynamics of regional distribution: the core and satellite species hypothesis. *Oikos*, 210-221.
- Hanski, I., 1982b. Distributional ecology of anthropochorous plants in villages surrounded by forest. In *Ann. Bot. Fenn.*, 1-15.
- Hanski, I., 1982c. Communities of bumblebees: testing the core-satellite species hypothesis. In *Ann. Zool. Fennici.*, 65-73.

- Hoberg, E.P., 1986. Evolution and historical biogeography of a parasite–host assemblage: *Alcataenia* spp. (Cyclophyllidea: Dilepididae) in Alcidae (Charadriiformes). *Can. J. Zool.*, 64, 2576-2589.
- Hoberg, E.P., Brooks, D.R., 2008. A macroevolutionary mosaic: episodic host-switching, geographic colonization, and diversification in complex host–parasite systems. *J. Biogeogr.* 35, 9, 1533-1550.
- Hoberg, E.P., Brooks, D.R., 2010. Beyond vicariance: integrating taxon pulses, ecological fitting and oscillation in historical biogeography and evolution. *The geography of host–parasite interactions*, 7-20.
- Hoberg, E. P., Brooks, D.R., 2013. 14 Episodic processes, invasion and faunal mosaics in evolutionary and ecological time. *The balance of nature and human impact*, 199-213.
- Hoberg, E.P., Brooks, D.R., 2015. Evolution in action: climate change, biodiversity dynamics and emerging infectious disease. *Philos. T. Soc. B.*, 370.
- Humason, L., 1979. *Animal Tissue Techniques*. W.H. Freeman and Company, 4th ed. San Francisco, 661.
- Ivanova, N.V., Zemlak, T.S., Hanner, R.H., Hebert, P.D.N., 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Mol. Ecol. Notes*, 7, 544-548.
- Janz, N., Nylin, S., 2008. The oscillation hypothesis of host plant-range and speciation. In *Specialization, speciation, and radiation: the evolutionary biology of herbivorous insects* (ed. KJ Tilmon). 203-215.
- Janz, N., 2011. Ehrlich and Raven revisited: mechanisms underlying codiversification of plants and enemies. *Annu. Rev. Ecol. Evol. S.* 42, 71-89.
- Janzen, D.H., 1985. Dan Janzen's thoughts from the tropics 1: On ecological fitting. *Oikos* 45, 3, 308-310.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K-I, Miyata, K., 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.*, 30, 14, 3059-3066.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A. Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A., 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 12, 1647-1649.

- Kelly, D.W., Paterson, R.A., Townsend, C.R., Poulin, R., Tompkins, D.M., 2009. Parasite spillback: A neglected concept in invasion ecology? *Ecology* 90, 8, 2047-2056.
- Lieberman, B.S., 2000. *Paleobiogeography*. New York: Plenum/Kluwer Academic.
- Lieberman, B.S., 2003a. Unifying theory and methodology in biogeography. *Evol. Biol.*, 33, 1-25.
- Lieberman, B.S., 2003b. Biogeography of the Cambrian Radiation: Deducing Geological Processes from Trilobite Evolution. *Spec. Pap. Palaeontol.*, 70, 59-72.
- Lim, B.K., 2008. Historical Biogeography of New World emballonurid bats (tribe Diclidurini): taxon pulse diversification. *J. Biogeogr.*, 35, 1385-1401.
- Littlewood, D.T.J, Bray, R.A., 2001. Interrelationships of the Platyhelminthes. *The Syst. Assoc. Spec.*, 60, 1-356.
- Lujan, N.K. Armbruster, J.W., Lovejoy, N.R., López-Fernández, H., 2015. Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 82, 269-288.
- Malcicka, M., Agosta, S.J., Harvey, J.A., 2015. Multi level ecological fitting: indirect life cycles are not a barrier to host switching and invasion. *Glob. Chang. Biol.* 21, 9, 3210-3218.
- Miller, M.A., Schwartz, T., Pickett, B.E., He, S., Klem, E.B., Scheuermann, R.H., Passarotti, M., Kaufman, S., O'Leary, M.A., 2015. A Restful API for Access to Phylogenetic Tools via the CIPRES Science Gateway. *Evol. Bioinform. Online*, 11, 43-48.
- Morand, S., Poulin, R., Rohde, K., Hayward, C., 1999. Aggregation and species coexistence of ectoparasites of marine fishes. *Int. J. Parasitol.*, 29, 5, 663-672.
- Nieberding, C., Libois, R., Douady, C.J., Morand, S., Michaux, J.R., 2005. Phylogeography of a nematode (*Heligmosomoides polygyrus*) in the western Palearctic region: persistence of northern cryptic populations during ice ages?. *Mol. Ecol.*, 14, 3, 765-779.
- Olson, P.D., Littlewood, D.T.J., 2002. Phylogenetics of the Monogenea – evidence from a medley of molecules. *Int. J. Parasitol.*, 32, 3, 233-244.
- Olsson-Pons, S., Clark, N.J., Ishtiaq, F., Clegg, S.M., 2015. Differences in host species relationships and biogeographic influences produce contrasting patterns of

- prevalence, community composition and genetic structure in two genera of avian malaria parasites in southern Melanesia. *J. Anim. Ecol.*, 84, 4, 985-998.
- Palumbi, S.R., 1996. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. (eds) *Mol. Syst.*, Sinauer Associates, Inc, 205–247.
- Penn, O.; Privman, E.; Ashkenazy, H.; Landan, G.; Graur, D.; Pupko, T., 2010. GUIDANCE: a web server for assessing alignment confidence scores.
- Pérez-del-Olmo, A., Morand, S., Raga, J.A., Kostadinova, A., 2011. Abundance–variance and abundance–occupancy relationships in a marine host–parasite system: the importance of taxonomy and ecology of transmission. *Int. J. Parasitol.*, 41, 13, 1361-1370.
- Prenter, J., Macneil, C., Dick, J.T.A., Dunn, A.M., 2004. Roles of parasites in animal invasions. *Trends Ecol. Evol.*, 19, 385-390.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572-1574.
- Seutin, G., White, B.N., Boag, P.T., 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Can. J. Zool. Canad. Zool.*, 69, 82-90.
- Spironello, M., Brooks, D.R., 2003. Dispersal and diversification: macroevolutionary implications of the MacArthur–Wilson model, illustrated by *Simulium* (Inseliellum) *Rubstov* (Diptera: Simuliidae). *J. Biogeog.* 30, 10, 1563-1573.
- Sundue, M.A., Testo, W.L., Ranker, T.A., 2015. Morphological innovation, ecological opportunity, and the radiation of a major vascular epiphyte lineage. *Evolution*, 69, 9, 2482-2495.
- Thompson, J.N., 2005. *The geographic mosaic of coevolution*. Chicago, University of Chicago Press.
- Vhora, M.S., Bolek, M.G., 2015. Temporal occurrence and community structure of helminth parasites in southern leopard frogs, *Rana sphenocephala*, from north central Oklahoma. *Parasitol. Res.*, 114, 3, 1197-1206.
- Werneck, M.R., Lima, E.H.S.M., Pires, T., Silva, R.J., 2015. Helminth Parasites of the Juvenile Hawksbill Turtle *Eretmochelys imbricata* (Testudines: Cheloniidae) in Brazil. *J. Parasitol.*, 101, 4, 500-503.
- Wiens, J.J., Ackerly, D.D., Allen, A.P., Anacker, B.L., Buckley, L.B., Cornell, H.V., Damschen, E.I., Jonathan, D.T., Grytnes, J-A., Harrison, S.P., Stephens, P.R.,

2010. Niche conservatism as an emerging principle in ecology and conservation biology. *Ecol. Lett.* 13, 10, 1310-1324.

CAPÍTULO III

Testando conceitos subordinados do Paradigma de Estocolmo: associações hospedeiros-parasitos na Baía de Paranaguá

Resumo: Interações entre espécies de parasitos e seus hospedeiros estão entre as relações ecológicas mais evolutivamente significativa. Compreender os fatores que regem esses relacionamentos, parece ser o caminho para desvendar algumas importantes teorias evolutivas. O presente estudo teve como objetivo testar através de dois conceitos ecológicos do Paradigma de Estocolmo, Ecological fitting e Teoria do Mosaico Geográfico de Coevolução a influência de eventos de alterações climáticas na estruturação de comunidades de hospedeiros e seus parasitos na Baía de Paranaguá. As espécies de parasitos foco nesse estudo são espécies de ovíparas e vivíparas de Gyrodactylidae. Espécies de Siluriformes foram as espécies hospedeiras mais representativas no estudo, mais precisamente espécies de Loricariidae e Callichthyidae, e uma espécie de Characiformes. Oito microbacias do sistema da Baía de Paranaguá foram analisadas, representando microbacias do Oeste e Norte da Baía. A composição da fauna de hospedeiro e parasitos foi visualizada em forma de redes de interação ecológica, a reconstrução histórica das associações do sistema foi reproduzida utilizando um algoritmo de comparação de árvores filogenéticas (PACT), esse resultado possibilitou a reconstrução da história ancestral das comunidades de hospedeiros e seus parasitos na Baía. As análises indicam a diferenciação na composição das comunidades representantes das microbacias do Oeste e do Norte da Baía. Algumas espécies de parasito só foram encontradas em microbacias do Oeste enquanto outras foram encontradas apenas em microbacias do Norte. Poucas espécies de parasitos apresentaram ampla distribuição no sistema estudado. As análises mostram que algumas poucas espécies de parasito mantem suas linhagens em microbacias onde não foi localizado seu hospedeiro original, essa capacidade está ligada ao processo de ecological fitting que permite que uma espécie de parasito sobreviva em hospedeiros que oferecem recursos compatíveis com seus hospedeiros original. O cladograma obtido pelo PACT indica eventos de isolamento e expansão na gama de hospedeiros para algumas espécies de Gyrodactylidae do sistema. A análise de ancestralidade sugere que as populações de parasitos e hospedeiros já se encontravam no sistema de estudo antes das perturbações de alternância do nível do mar ocorridas na Baía de Paranaguá decorrentes de eventos eustáticos durante o Pleistoceno. O padrão de estruturação das comunidades do sistema da Baía parece ter sido influenciado tanto por eventos históricos causados por transgressões marinhas que isolaram as populações e regressões marinhas que conectaram as microbacias, misturando as populações, quanto por eventos mais recentes. As associações observadas entre hospedeiros-parasitos no presente estudo indicam fortemente influência do processo de ecological fitting na dinâmica das comunidades do sistema da Baía de Paranaguá.

Palavra-chave: Paradigma de Estocolmo, Ecological Fitting, Mosaico Geográfico de Coevolução, PACT, Gyrodactylidae

Abstract: Interactions between species of parasites and their hosts are among the ecological relationships most evolutionarily significantly. Understand the factors governing these relationships, seems to be the way to unveil some important evolutionary theories. The present study aimed to test through two ecological concepts of the Stockholm Paradigm, Ecological fitting and Geographic Mosaic Theory of Coevolution the influence of climate change events in the structuring of hosts communities and their parasites in the Bay of Paranaguá. The parasite species focus in this study are oviparous and viviparous Gyrodactylidae species. Siluriformes were the most representative host species in the study, more precisely species of Loricariidae and Callichthyidae, and a one Characiformes species. Eight microbasins of the Paranaguá Bay system were analyzed, representing microbasins of the West and North. The composition of the host and parasites fauna was visualized in the ecological interactions networks form, the historical reconstruction of the associations of the system was reproduced using an algorithm of the phylogenetic comparing trees (PACT), this result made possible the reconstruction of ancestral history of the communities of hosts and their parasites at bay. The analyses indicate the differentiation in the composition of representatives microbasins communities of West and North of the bay. Some species of parasite were only found in microbasins of the West while others were found only in microbasin of the North. Few species of parasites showed wide distribution in system studied. The analyzes show that some few species of parasite maintained their lineages in microbasins where was not located its original host, this ability is linked to the ecological fitting process that allows a parasite species survives in hosts that offer resources compatible with their original hosts. The cladogram obtained by PACT indicates isolation and expansion events in the host range for some Gyrodactylidae species of the system. The ancestrality analysis suggests that the populations of parasites and hosts were already in the system study before disturbances in sea level occurred in the Paranaguá Bay arising from eustatic events during the Pleistocene. The pattern of structuring of the bay system communities seems to have been influenced both by historical events caused by marine transgressions that isolated populations and marine regressions that connected the microbasins, mixing the populations, and by more recent events. The associations observed between hosts-parasites in this study indicate strongly influence of ecological fitting process in the dynamics of Paranaguá Bay system communities.

Keyword: Stockholm Paradigm, Ecological fitting, Geographic Mosaic of Coevolution, PACT, Gyrodactylidae

I. Introdução

O parasitismo é considerado uma associação ecológica entre espécies, na qual uma espécie, o parasito, vive sobre ou dentro do corpo de um hospedeiro. O parasito pode passar a maior parte de sua vida em associação com uma ou mais espécies de hospedeiros (Anderson & May, 1978). Esses organismos estão distribuídos em

diversos grupos taxonômicos, podendo representar mais da metade da biodiversidade conhecida (Toft, 1986).

A relação entre hospedeiros e parasitos é uma das interações bióticas mais evolutivamente significativa (Schmid-Hempel, 2011). A ubiquidade entre as interações hospedeiro-parasito ressalta a necessidade de melhorar a compreensão sobre quais fatores geram, mantêm e restringem essas associações (Brooks & Ferrao, 2005; Brooks et al., 2006; Brooks & Hoberg, 2007). Muitos autores acreditam que a especificidade em relação a um determinado hospedeiro contém a chave para a compreensão da evolução das associações entre hospedeiro-parasito (Anderson & May, 1978; Brooks & McLennan, 1991; 1993; Thompson, 1997; 2005; Agosta et al., 2010). A compreensão dos fatores que influenciam os relacionamentos hospedeiros-parasitos desempenha um papel fundamental em desvendar inúmeras teorias evolutivas e ecológicas.

A maioria das espécies de parasito parece ser especialistas em recursos (Agosta et al., 2010) e utilizam apenas uma espécie hospedeira. Esse padrão aparente deu origem à ideia que a especialização seria um “beco sem saída” evolutivo, ou seja, o parasito se torna cada vez mais bem adaptado ao seu hospedeiro perdendo a habilidade de mudar de hospedeiros (Thompson, 1994). Estudos empíricos sobre a evolução de sistemas hospedeiros e seus parasitos, no entanto, têm concluído que linhagens de parasitos “generalistas” muitas vezes são derivadas de “especialistas” através de eventos de troca de hospedeiros (Scheffer & Wiegmann, 2000; Janz et al., 2001; Kergoat et al., 2005; Yotoko et al., 2005).

A colonização de novos hospedeiros tem-se demonstrado um processo importante por trás da diversificação das próprias interações (gerando novas associações de espécies), bem como dos táxons envolvidos (aumentando as taxas de especiação) (e.g. Boeger et al., 2003; Agosta et al., 2010). Este padrão, no qual parasitos aparentemente especialistas (e portanto, altamente adaptados a seu hospedeiro) são capazes de trocar para novos hospedeiros foi denominado por esses como o “paradoxo do parasitismo” (Agosta et al., 2010).

Brooks e McLennan (2002) sugerem que parasitos, além de especialistas e generalistas, podem ser falsos especialistas ou falso generalistas. Falsos especialistas, na realidade, são generalistas restritos a poucos ou a um único recurso por fatores ecológicos (oportunidade), tais como competição, microclima local ou em

distribuição de espécies hospedeiras. Por outro lado, falsos generalistas são especializados em um recurso que é filogeneticamente muito difundido (e.g. todas espécies de um gênero de hospedeiro retém um recurso plesiomórfico). Essas ideias derivam da proposta de Nyman (2009), de que parasitos não são especializados em uma espécie hospedeira em particular, mas especializados nos recursos que podem ou não ser evolutivamente compartilhados entre muitas espécies. Para falsos generalistas e falsos especialistas a troca de hospedeiro pode ser iniciada simplesmente por uma mudança em circunstância ecológica (e.g. mudança na disponibilidade do hospedeiro local, ou extinção local de um competidor = oportunidade) (Agosta et al., 2010).

De acordo com Agosta e Klemens (2008), os organismos possuem a capacidade de sobreviver sob condições distintas daquelas nas quais vivem. Essa capacidade é decorrente do *ecological fitting* (Janzen, 1985; Agosta & Klemens, 2008) da espécie, o qual é representado por um espaço denominado de *sloppy fitness space* (Agosta et al., 2010). Agosta et al. (2010) sugerem que os organismos são capazes de se ajustar ecologicamente a novos hospedeiros de duas formas. O parasito pode se deslocar para uma nova espécie hospedeira que possui recursos iguais ou muito semelhantes aqueles do hospedeiro antigo – troca de hospedeiro por rastreamento de recursos - ou, o parasito pode obter *fitness* em hospedeiros que representam um novo recurso através do uso de “áreas” do *sloppy fitness space* (SFS). Esse processo é comum na natureza e resulta de interações entre organismos altamente flexíveis e de ambientes bióticos e abióticos altamente variáveis (Agosta & Klemens, 2008). *Ecological fitting* desempenha um papel importante na formação de comunidades, representando um mecanismo adicional para coespeciação e coevolução, preparando o palco para a codiversificação durante períodos de relativa estabilidade pontuadas por troca de hospedeiro durante episódios de mudanças climáticas (Agosta, 2006; Hoberg & Brooks, 2008; Hoberg & Brooks, 2010; Hoberg & Brooks, 2015). A troca de hospedeiros e dispersão geográfica dos parasitos são fenômenos comuns, ocorrendo em diferentes escalas temporais e espaciais (Hoberg & Brooks, 2008). Sua diversificação envolve tanto eventos de coevolução quanto de colonização, e esses processos explicam as associações complexas entre hospedeiros e parasitos. Na coespeciação, a associação entre hospedeiro-parasito pode ser tão especializada e exclusiva que a especiação em uma linhagem causa a especiação na outra (Page,

2003). As associações atualmente observadas entre os organismos são evidências da história evolutiva compartilhada e de processos não-adaptativos (Agosta, 2006). Em uma visão contrária a descrita acima, Page (2003) sugere que a aparente incongruência entre a filogenia de hospedeiros e parasitos seria resultado de eventos de extinção e não de troca de hospedeiro. Esse é o pensamento da escola de máxima coespeciação, a qual parte do pressuposto de que coevolução leva a especialização e portanto a um processo de evolução do tipo beco sem saída (Araujo et al., 2015). Em casos de parasitos que exibem uma gama de hospedeiros maior do que uma única espécie, a espécie hospedeira com a qual esse parasito estará coevoluindo, será sempre a que mostrar o maior grau de coespeciação. De acordo com Page (2003), os parasitos mais diversos e/ou persistentes devem coexistir com grupos de hospedeiros mais diversos e/ou persistentes.

Entretanto, segundo Hoberg e Brooks (2008), a maioria das associações hospedeiro-parasito podem ser explicadas por uma interação histórica entre esses organismos, episódios alternados de aumento e redução do espectro de hospedeiros (*Hipótese de Oscilação* Janz & Nylin, 2008; Nylin et al., 2014). Esse conceito está entre as quatro bases do *Paradigma de Estocolmo* (ver Hoberg & Brooks, 2015), incluindo o conceito de *Ecological fitting*, Teoria do *Mosaico Geográfico de Coevolução* (Thompson, 2005) e *Taxon Pulse* (Erwin, 1985).

A Teoria do Mosaico Geográfico de Coevolução explica que em geral dinâmicas coevolucionárias de interações são impulsionadas por três componentes de estrutura geográfica: (i) **seleção de mosaicos**, seleção natural varia sobre as interações de diferentes comunidades; (ii) **hotspots coevolucionário**, comunidades em que a interação entre espécies têm efeitos recíprocos sobre *fitness* e muitas vezes são incorporados dentro das comunidades vizinhas em que a seleção interespecífica afeta apenas uma ou nenhuma das espécies – *cold spots* e (iii) **traços misturados**, a combinação de fluxo gênico, deriva genética aleatória, e dinâmica de extinção/colonização, remodela continuamente a paisagem genética sobre a qual a futura seleção ocorre. Este processo coevolucionário tripartido deve produzir três padrões ecológicos gerais: diferentes combinações de traços co-evoluindo em diferentes regiões, má-adaptação local dentro de algumas interações, e alguns traços co-evoluindo geograficamente (Gomulkiewicz et al., 2000).

Taxon Pulse é fortemente associado a episódios de mudança ambiental, criando oportunidades para troca de hospedeiros durante os períodos de expansão geográfica e permitindo a coevolução e coespeciação durante os períodos de isolamento geográfico (Brooks & Hoberg, 2013).

Tschá (2016) sugere que as alterações do nível do mar nessa região da planície costeira paranaense promoveram ciclos de isolamento e união entre as microbacias (Martin, 2003) e possivelmente influenciaram a diversificação genética da fauna aquática regional. O modelo proposto para o presente estudo é composto por sistema hospedeiro-parasito. Os peixes hospedeiros são, na sua maioria, Siluriformes, membros de Loricariidae e Callichthyidae, e uma espécie de Characiformes, organismos de água doce, com baixa tolerância para águas com salinidade elevada. Os parasitos representam espécies da classe Monogeneoidea, mais especificadamente, espécies de Gyrodactylidae Van Beneden et Hesse, 1863. Os Gyrodactylidae são ectoparasitos de peixes marinhos, estuarinos ou de água-doce, crustáceos, anfíbios e lulas (Bakke et al., 1992). A família inclui espécies ovíparas e vivíparas. Segundo Boeger et al. (2003) o grande potencial evolutivo das espécies do grupo é consequência da combinação de características plesiomórficas e apomórficas que potencializam a capacidade de explorar o espaço representado por espécies hospedeiras. A característica de maior destaque, nesse processo, é a capacidade de trocar de hospedeiros ao longo de toda sua vida, e não apenas durante o estágio larval como a maioria dos platielmintos parasitos (Boeger et al., 2005).

Sob esse o cenário paleoclimático da região da Baía de Paranaguá, as populações de peixes de água doce foram submetidas a eventos cíclicos de expansões e isolamentos de bacias hidrográficas (Tschá, 2016). Esse estudo assume que todas as espécies presentes, tanto de parasito quanto de hospedeiros, já se encontravam presentes antes dos eventos hipotetizados abaixo (a origem das espécies pré-datam os eventos descritos a seguir). As comunidades de peixes e seus parasitos dessas microbacias, portanto, passaram por um processo de mistura de espécies devido à fusão das bacias em uma única paleobacia durante expansões, períodos de baixo nível do mar – cerca de 130 metros abaixo do nível atual a cerca de 18.000 anos atrás (Kowsmann & Costa, 1974; Correa, 1996) e isolamento, quando o nível do mar atingiu 10 metros acima do nível atual, há cerca de 120.000 anos atrás e 5,3 metros há 5.100 anos unidos em uma. Durante expansões, as espécies que

compunham as comunidades desses rios tiveram a oportunidade de dispersar intensamente entre sistemas hidrográfico hoje isolados; por outro lado, durante períodos de transgressões marinhas, componentes dessas comunidades foram isolados e submetidos a processos ecológicos que determinaram a composição das bacias agora isoladas. Como o tamanho dessas bacias varia, espera-se que os processos ecológicos envolvidos variem (e.g. extinção local; processos dependentes da densidade; dentre outros) resultando em comunidades estruturalmente distintas.

O procedimento escolhido para esse processo incorpora a visualização de sistemas hospedeiros-parasitas locais em redes. A análise de redes ecológicas permite comparar padrões estruturais de cada microbacia, podendo revelar indícios de eventos históricos envolvidos na composição dos sistemas simbióticos (veja Bascompte et al., 2003; Poulin, 2010). Redes especializadas de sistemas hospedeiro-parasito tendem a apresentar baixa conectância, ou seja, menor número de interações observadas em relação ao número potencial de interações que essa rede poderia apresentar (Pimm, 1982). Adicionalmente, espera-se para essas redes uma estrutura mais modular do que as redes dominadas por espécies generalistas (Fortuna, et al., 2010; Bellay et al., 2011; Krasnov et al., 2012). A estrutura modular é caracterizada pelos grupos de espécies que interagem mais entre si do que com outras espécies presentes na mesma rede, formando assim módulos ou compartimentos (Bellay et al., 2013). Há evidências de que os processos que criam padrões de interação em redes ecológicas (e.g. filogenia, co-evolução, diversidade funcional e estrutura do habitat) tendem a ser mais forte dentro de módulos (Bellay et al., 2011; Krasnov et al., 2012; Poulin et al., 2013; Olesen et al., 2007), e cada espécie em uma rede tem o seu próprio padrão de interação (Bellay et al., 2013).

A visualização destes sistemas biológicos em redes pode informar sobre relações dentro de uma comunidade (e.g., hospedeiros-parasito), bem como prever como ela poderá responder a perturbações, tais como a adição de uma espécie por migração ou invasão, ou ainda, sua remoção seguida de uma extinção local (Graham et al., 2009). Segundo Proulx et al. (2005) para desenvolver melhores modelos de redes biológicas, devemos levar em conta três características fundamentais: (1) redes podem ganhar ou perder os nós (número de espécies com as quais uma dada espécie interage); (2) as propriedades de nós pode mudar; e (3) as forças externas podem atuar na estrutura da rede. Logo, precisamos incorporar o efeito que a seleção natural

pode ter não só no indivíduo (por exemplo, genes ou espécie), mas também em toda a estrutura da rede. As propriedades específicas das entidades biológicas que compreendem estas redes também influenciarão a dinâmica de sua formação.

A partir desses pressupostos citados acima, o presente estudo tem como objetivo avaliar as diferenças entre as comunidades de peixes, incluindo a composição dos sistemas hospedeiros-parasitos, nos rios da Baía de Paranaguá. Uma vez estabelecido que diferenças existem na estrutura dessas comunidades, esse estudo pretende explorar previsões derivadas de dois elementos fundamentais do Paradigma de Estocolmo (Hoberg & Brooks, 2015), *Ecological fitting* e *Mosaico Geográfico de Coevolução*.

II. Material e Métodos

Material biológico

Hipóteses, previsões e fundamentação lógica

O modelo utilizado para testar previsões derivadas de elementos do Paradigma de Estocolmo é representado por subcomunidades de organismos dulcícolas distribuídos em sub-bacias do entorno da Baía de Paranaguá. Essas bacias e suas respectivas comunidades de animais foram submetidas aos mesmos processos paleoclimáticos, em especial aqueles associados às flutuações do nível do mar (vide Tschá, 2016). O pressuposto do modelo é que os elementos dessas comunidades foram fragmentados em habitats de tamanhos variados (conforme diversas características fisiográficas e a proximidade da Serra do Mar) durante a máxima de nível do mar mais recente (cerca de 10 metros há aproximadamente 120.000 anos atrás). Processos estocásticos devem ter atuado sobre cada um desses fragmentos, provavelmente gerando redes hospedeiros-parasitos distintas da original.

Esse cenário histórico recente oferece uma oportunidade excepcional de teste de previsões derivadas de dois elementos importantes do Paradigma de Estocolmo (Hoberg e Brooks, 2015): *Ecological Fitting* e a Teoria do Mosaico Geográfico de Coevolução. Tais previsões são listadas a seguir, cada uma acompanhada por uma breve explanação de seus fundamentos.

1. O conceito de *Ecological Fitting* indica que, mesmo na ausência de seu hospedeiro original, uma espécie de parasito poderá sobreviver. Portanto, no

modelo aqui utilizado, espera-se que, mesmo hospedeiros que apresentem alta prevalência em uma ou mais microbacias para uma determinada espécie de parasito esteja ausente em outra microbacia, o parasito não necessariamente estará igualmente ausente.

Racional: *A visão tradicional em parasitologia (máxima coespeciação/especialização) prevê que as espécies de parasitos que habitam os hospedeiros extintos também se extinguem. Entretanto, o Paradigma de Estocolmo, através de seu elemento Ecological Fitting, permite prever que, em alguns casos “a extinção do hospedeiro original não irá resultar necessariamente na extinção da linhagem do parasito, mesmo se o parasito for altamente especializado nesse hospedeiro” (Hoberg & Brooks, 2008; Agosta et al., 2010; Araujo et al., 2015). Resultados empíricos apresentam evidências de que linhagens de parasitos tenham sobrevivido, através de trocas de hospedeiros, à extinção de seus hospedeiros preferenciais (Hoberg, 1995).*

2. Em comunidades com maior disponibilidade (oportunidade) de hospedeiros, maior é o espectro de parasitos utilizados.

Racional: *Espécies de parasitos podem utilizar mais de uma espécie de hospedeiros desde que eles estejam presentes (oportunidade) e representem recursos semelhantes (compatibilidade) (Araujo et al., 2015). Espera-se, portanto, sob Ecological Fitting, que quanto maior for a oportunidade (i.e. maior o número de espécies hospedeiras) maior o espectro de hospedeiros utilizados por uma espécie de parasitos.*

3. Os hospedeiros que compõem o espectro de hospedeiros de uma espécie representam, na sua maior frequência, hospedeiros filogeneticamente próximos.

Baseados em um modelo composto pelas espécies neotropicais de Monogenoidea e seus hospedeiros, Braga et al. (2014) sugerem que o compartilhamento de parasitos é fortemente determinado pela proximidade filogenética das espécies hospedeiras. Nesses casos, hospedeiros parasitados devem representar recursos compatíveis por compartilhamento de características plesiomórficas (i.e. conservatismo filogenético. Todavia, convergência evolutiva (i.e. quando as espécies são ecofisiologicamente semelhantes por convergência; vide Malcicka et al., 2015) pode também definir que os recursos necessários para a sobrevivência de uma determinada linhagem de parasito estejam presentes em hospedeiros filogeneticamente mais distantes.

4. Uma mesma espécie de parasito pode apresentar parâmetros ecológicos por espécie hospedeira distintos entre comunidades que apresentam composição de hospedeiros diferentes.

Racional: *A Teoria do Mosaico Geográfico de Coevolução (Thompson, 2005) sugere que existe uma variação (mosaico) espacial da compatibilidade de espécies de parasitos a um ou mais hospedeiros. Adicionalmente, a Teoria de Oscilação (Janz & Nylin, 2008; Nylin et al., 2014) sugere que processos de expansão (aumento do espectro de hospedeiros) podem gerar linhagens evolutivas em resposta a pequenas diferenças da qualidade do recurso disponível por espécies distantes de hospedeiros. No contexto desse estudo, variações espaciais na prevalência/abundância de associações específicas, um proxy de compatibilidade como sugerido por Patella (capítulo II) pode indicar um processo de especialização de uma espécie parasita para diferentes espécies hospedeiras em simpatria ou alopatria como resultado do processo de co-acomodação/adaptação entre parasitos e hospedeiros (Araujo et al., 2015).*

Coletas

As coletas foram realizadas nos rios das principais microbacias hidrográficas do litoral do Paraná (Figura 1) em Abril, Maio, Julho, Agosto, Setembro e Outubro de 2012 e Janeiro, Maio, Outubro e Novembro de 2013. Foram realizadas coletas nos rios das sub-bacias do Oeste: Brejatuba (microbacia do Rio Guaraguaçu), Sagrado e do Meio (microbacia do Rio Sagrado), Marumbi, do Pinto e Passa Sete (microbacia do Rio Nhundiaquara), do Nunes e Cacatu (microbacia do Rio Cacatu), e Saci e Mergulhão (microbacia do Rio Cachoeira). As sub-bacias do Norte foram representadas pelos rios Capivari e Tagaçaba (microbacia do Rio Tagaçaba), Pederneiras e Bananal (microbacia do Rio Serra Negra) e Morato (microbacia do Rio Guaraqueçaba) (Tabela 1).

Representantes de oito espécies de peixes hospedeiros foram capturados principalmente com a técnica de eletronarcose (pesca elétrica). Quando necessário para aumentar o número amostral dos espécimes/espécies foram utilizados rede de arrasto de 15 m (malha 12 mm) e/ou tarrafa (malha de 12 mm). Em média contamos com seis pessoas para realizar as coletas: duas pessoas responsáveis pelos dois puçás que estão conectados em um cabo de aproximadamente 50 m e ligado a um gerador (tensão de aproximadamente 600 volts), uma pessoa responsável pelo cabo que conecta os puçás ao gerador para que não ficasse preso nas pedras no fundo

dos rios, uma ou duas pessoa(s) no rio colocando manualmente cada peixe hospedeiro (anestesiado pelo choque) individualmente em saco plástico para não haver contaminação de parasitos entre as amostras, e finalmente uma pessoa recebendo o material e responsável por sacrificar e fixar os indivíduos em campo (metodologia descrita logo abaixo). Para manter um padrão no controle das amostragens, foi realizada três repetições no sentido montante-jusante na forma de zigue-zagues pela área pré-determinada a aproximadamente 50 m a partir de um ponto de entrada no rio e três repetições a 50 m no sentido jusante-montante a partir desse ponto. Para cada rio amostrado foi determinado um mínimo de 20 indivíduos por espécie.

Cada espécime colocado em saco plástico foi anestesiado com cloreto de benzocaina (código 01160 do DCB de 2007) e posteriormente eutanasiado com secção medular. Em seguida foi adicionado água a 65 °C (aproximadamente 100 ml) e agitando vigorosamente para facilitar o desprendimento dos parasitos (Kritsky & Stockwell, 2005). O procedimento com água aquecida é necessário para que os parasitos sejam sacrificados sem que haja a contração de seu corpo, o que prejudica sua determinação taxonômica. Cada amostra foi dividida em dois sacos. Parte de cada amostra foi fixada em formol 5% (aproximadamente 100 ml), para ser utilizada em procedimentos morfológicos, e parte (a que contém o peixe hospedeiro) fixada em etanol 95% (aproximadamente 100 ml), para ser utilizada em processamentos moleculares. Em laboratório, foi retirado parte do tecido de cada peixe hospedeiro e conservado em tampão hipersalino para posterior procedimento molecular. A determinação taxonômica de todas as espécies hospedeiras foi conferida por procedimentos moleculares. Os espécimes coletados foram levados ao Museu do Capão da Imbuia em Curitiba, para posterior confirmação pelo Dr. Vinícius Abilhoa.

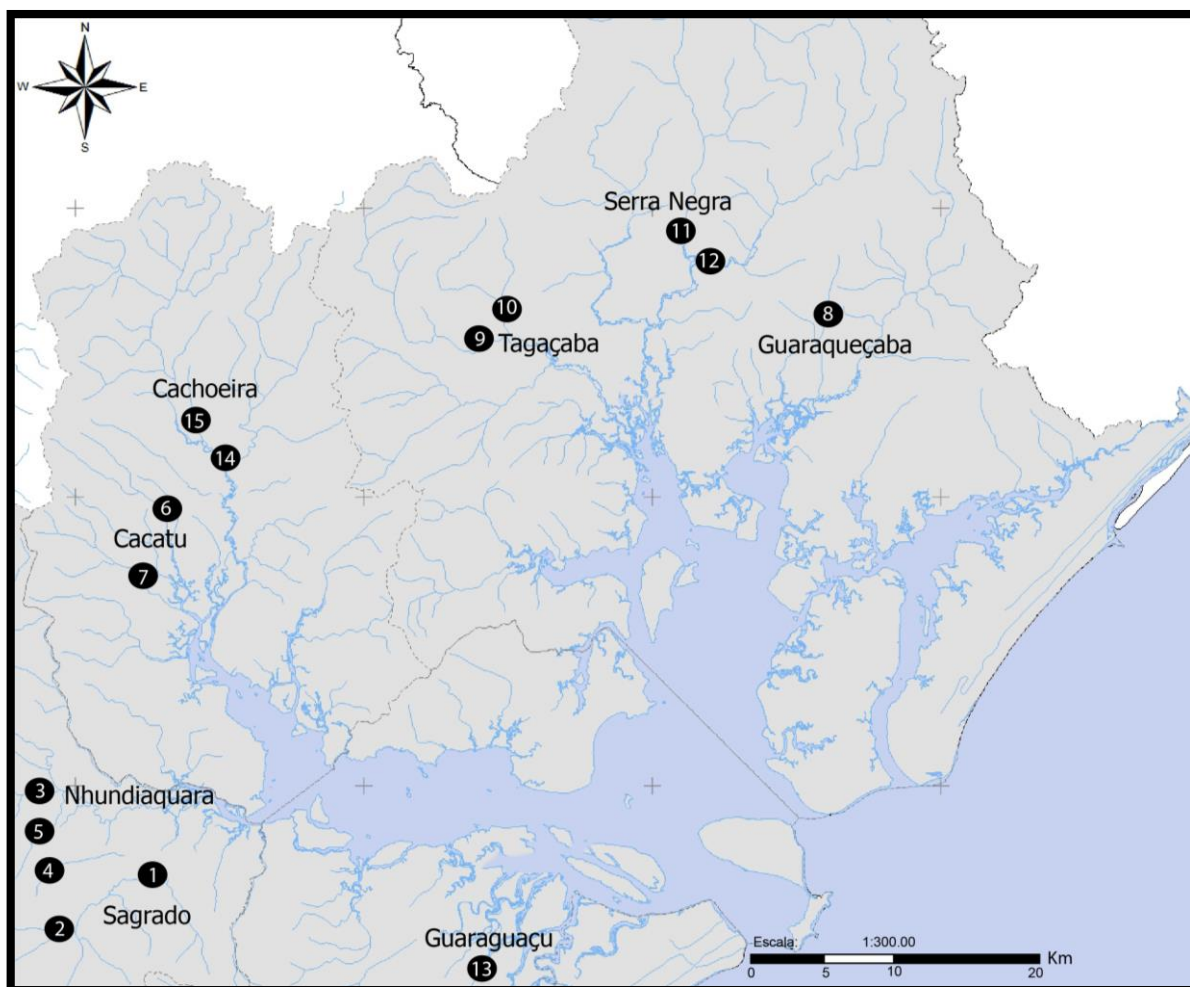


Figura 1. Mapa ilustrando a Baía de Paranaguá. Os números localizam os rios amostrados nesse estudo e suas respectivas microbacias. 1) Rio Sagrado, 2) Rio do Meio, 3) Rio Marumbi, 4) Rio do Pinto, 5) Rio Passa Sete, 6) Rio do Nunes, 7) Rio Cacatu, 8) Rio Morato, 9) Rio Capivari, 10) Rio Tagaça, 11) Rio Pederneiras, 12) Rio Bananal, 13) Rio Brejatuba, 14) Rio Saci e 15) Rio Mergulhão.

Tabela 1. Coordenadas geográficas de cada microbacia amostrada no presente estudo, com informações dos rios e municípios.

<i>Microbacia</i>	<i>Rio</i>	<i>Coordenadas</i>	<i>Localidade</i>
GUARAGUAÇU SAGRADO	Brejatuba	S 25° 38' 29,0" W 48° 37' 14,0"	Paranaguá, PR, Brasil
	Sagrado	S 25° 33' 23,9" W 48° 48' 04,9" S 25° 32' 14,2" W 48° 46' 00,0" S 25° 31' 34,6" W 48° 45' 03,2"	Morretes, PR, Brasil
NHUNDIAQUARA	do Meio	S 25° 33' 32,7" W 48° 48' 55,9"	Morretes, PR, Brasil
	Marumbi	S 25° 30' 31,4" W 48° 52' 30,2" S 25° 30' 11,1" W 48° 51' 25,3" S 25° 29' 10,4" W 48° 49' 48,0"	
	do Pinto	S 25° 32' 48,7" W 48° 51' 53,0" S 25° 30' 50,3" W 48° 50' 34,2" S 25° 31' 35,0" W 48° 50' 20,0"	
	Passa Sete	S 25° 32' 35,7" W 48° 50' 04,9" S 25° 31' 32,9" W 48° 48' 22,9" S 25° 31' 15,0" W 48° 47' 50,0"	

Continua			
CACATU	Cacatu	S 25° 19' 25,0" W 48° 45' 06,9"	Antonina, PR, Brasil
	do Nunes	S 25° 20' 19,2" W 48° 47' 04,6"	
CACHOEIRA	Saci	S 25° 14' 13,9" W 48° 45' 09,9"	Guaraqueçaba, PR, Brasil
	Mergulhão	S 25° 17' 37,8" W 48° 44' 23,7"	
TAGAÇABA	Tagaçaba	S 25° 11' 38,7" W 48° 31' 17,8"	Antonina, PR, Brasil
	Capivari	S 25° 11' 03,4" W 48° 31' 22,8"	
SERRA NEGRA	Pederneiras	S 25° 08' 34,8" W 48° 23' 38,0"	Guaraqueçaba, PR, Brasil
	Bananal	S 25° 10' 41,5" W 48° 22' 51,4"	
		S 25° 10' 31,2" W 48° 22' 18,6"	
GUARAQUEÇABA	Morato	S 25° 12' 48,8" W 48° 17' 52,6"	Guaraqueçaba, PR, Brasil

Morfologia

Alguns espécimes de girodactídeos foram utilizados na preparação de lâminas em meio de montagem de Hoyer (Humason, 1979) para confirmação de sua identidade através das estruturas esclerotizadas. Quando identificada uma nova espécie foram preparadas lâminas permanentes usando corante de Tricrômico de Gomori e montados com bálsamo do Canadá (Humason, 1979) para posterior descrição. Essa técnica permite a visualização de suas estruturas moles. Os índices de abundância média e prevalência para cada espécie de Gyrodactylidae foram estabelecidos conforme proposto por Bush et al. (1997).

Molecular

A extração do DNA total de cada espécime de girodactídeo foi obtida utilizando Kit DNeasy (Qiagen) adaptado para monogenóides. Cada espécime extraído foi identificado através de confecção de lâminas testemunho, onde as estruturas esclerotizadas (háptor e órgão copulatório masculino) foram montadas em meio Hoyer (Humason, 1979). O DNA total de cada espécime hospedeira foi extraído usando o kit Ez-DNA (Biosystems, Brasil) e robô de extração de DNA IPREP (Invitrogen), utilizando kit específico para extração seguindo protocolo e orientações do fabricante.

A amplificação do DNA dos girodactídeos foi realizada com três marcadores. Gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II (COII), região do espaçador transcrito interno (ITS1 – ITS2) e região ribossomal do 18S (Tabela 2). A reação em cadeia da polimerase (PCR) de todos os marcadores foi otimizada para: 20-40 ng de extrato de DNA, 3 mM de MgCl₂, 1x de PCR-Buffer, 0,4 mM de dNTP, 0,5 pmoles de cada marcador, 1U de Platinum Taq DNA-polimerase (Invitrogen) e água ultrapura até completar volume final de 25 µl. O programa da PCR para todos os marcadores foi otimizado para: desnaturação inicial à 95 °C por 5 min, seguidos de 40 ciclos de 95 °C

por 30 sec, anelamento a diferentes temperaturas (Tabela 2) por 45 sec, extensão à 72 °C por 45 sec e extensão final à 72 °C por 5 min.

Tabela 2. Lista dos marcadores com suas sequências e temperaturas de anelamento (T) utilizados na amplificação do DNA dos parasitos para cada gene testado no presente estudo.

	Marcador	Sequência dos Marcadores 5'- 3'	T (°C)	Referência
COII	COX2F2	TTTCACTGAGATAAGTCGTAAC	42	Bueno-Silva & Boeger, 2014
	COX2R	AATAMWKATWGGCATRWAAGARTG		Bueno-Silva & Boeger, 2014
ITS	ITS1A	GTAACAAGGTTTCCGTAGGTG	49	Matějusková et al., 2001
	ITS2	TCCTCCGCTTAGTGATA		Matějusková et al., 2001
18S	worm-A	ACGAATGGCTCATTAAATCAG	50	Littlewood & Bray, 2001
	18S7F	GCCCTATCAACTTACGATGGTA	65	Littlewood & Bray, 2001
	600F/18S-8	GCAGCCGCGGTAAGTCCAGC	53	Littlewood & Bray, 2001
	930F	GCATGGAATAATAGATAGG	48	Littlewood & Bray, 2001
	1100R	GATCGTCTTCGAACCTCTG	50	Littlewood & Bray, 2001
	18S4/1400R	AGCGACGGGCGGTGTGTAC	65	Littlewood & Bray, 2001
	18SF	CCAGCTTGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	53	Littlewood & Bray, 2001

A amplificação do DNA das espécies hospedeiras foi realizada com três marcadores, gene mitocondrial citocromo oxidase b (cyt-b), citocromo oxidase I (COI) e o gene nuclear codificador de proteínas Rodopsina (RH) (Tabela 3). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi otimizada para: 50 ng de extrato de DNA, 3 mM de MgCl₂, 1x de PCR-Buffer, 0,4 mM de dNTP, 0,5 pmoles de cada marcador, 1U de Platinum Taq DNA-polimerase (Invitrogen) e água ultrapura até completar volume final de 25 µl. O programa da PCR para todos os marcadores foi otimizado para: desnaturação inicial à 95 °C por 4 min, seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 45 sec, anelamento a diferentes temperaturas por 45 sec (Tabela 3), extensão à 72 °C por 45 sec e extensão final à 72 °C por 5 min.

Tabela 3. Lista dos marcadores com suas sequências e temperaturas de anelamento (T) utilizados na amplificação do DNA dos hospedeiros para cada gene testado no presente estudo.

	Marcadores	Sequencia do Marcador 5'- 3'	T (°C)	Referência
Cyt-b	Gludg.I	TGACCTGAARAACCAAYCGTTG	50	Palumbi, 1996
	H16460	CGAYCTTCGGATTACAAGACCG		Palumbi, 1996
COI	FF2d	TTCTCCACCAACCACAARGAYATYGG	58	Ivanova et al., 2007
	FR1d	CACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA		Ivanova et al., 2007
RH	RHPco1F	CATCGTCCGGAGTCCTTATG	50	Chen et al., 2003
	RH1039R	TGCTTGTTTCATGCAGATGTAGA		Chen et al., 2003

A visualização dos produtos amplificados foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com GelRed (Biotium) e revelado em luz ultra-violeta.

Os produtos amplificados dos peixes hospedeiros foram purificados com PEG 8.000 e dos parasitos com kit MinElute (Qiagen).

Análise filogenética

A análise filogenética dos girodactilídeos foi realizada concatenando os três genes sequenciados (18S, COII, ITS) para as 22 espécies de girodactilídeos. As sequências foram editadas no programa BioEdit v.7.0.9 (Hall, 1999) e Geneious v.4.5 (<http://www.geneious.com/>, Drummond et al., 2011). Três sequencias de espécies de *Benedenia* foram utilizadas como grupo externo (Tabela 4). A escolha de *Benedenia* spp. como grupo externo foi baseada em seu relacionamento filogenético com as espécies de Gyrodactylidae (Olson & Littlewood, 2002). Os alinhamentos foram concatenados utilizando o servidor FaBox (<http://www.birc.au.dk/software/fabox/>, Villesen, 2007), utilizando a ferramenta "Fasta alignment joiner", adotada para uma melhor resolução da análise. O alinhamento concatenado foi conferido ao programa ClustalW (Thompson et al., 1994), disponível no servidor GUIDANCE (<http://guidance.tau.ac.il/>; Penn et al., 2010). O servidor foi utilizado para orientar na remoção de regiões do alinhamento que apresentaram baixa confiabilidade, em seguida foi aplicado uma ferramenta que mascara as regiões não confiáveis. Essa ferramenta foi calibrada para manter 90% do alinhamento e substituir os pontos mais problemáticos por "N". Para inferência bayesiana, o modelo inicial de evolução analisado foi definido (GTR+G+I) através do programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Análise de inferência Bayesiana foi implementada com o programa BEAST 1.8.0 (Drummond et al., 2012). Os valores de probabilidades posteriores foram estimados através de quatro corridas independentes com 100 milhões de gerações, amostradas a cada 10.000 gerações, taxa evolutiva estimada de 5,5% Ma (Ziętara & Lumme, 2002) e aplicando o modelo "yule process" (Gernhard, 2008).

Tabela 4. Identificação das espécies de parasito utilizadas como grupo externo na análise filogenética dos Gyrodactylidae e disponíveis no GenBank.

Parasitos	GenBank
<i>Benedenia epinepheli</i> (Yamaguti, 1937)	EU707802
<i>Benedenia</i> sp. 1	
<i>Benedenia</i> sp. 2	

A análise filogenética das espécies hospedeiras foi realizada concatenando os três genes sequenciados (Cyt-b, COI, RH) para 14 espécies. Cinco sequências de espécies hospedeiras pertencentes à Pimelodidae foram inseridas como grupo externo (Tabela 5) e o loricarídeo, *Hisonotus leucofrenatus* (Miranda Ribeiro, 1908). A escolha dessas espécies como grupo externo foi baseada em seu relacionamento filogenético com os hospedeiros estudados. As sequências foram editadas no programa BioEdit v.7.0.9 (Hall, 1999) e Geneious v.4.5 (<http://www.geneious.com/>, Drummond et al., 2011). Os alinhamentos dos hospedeiros também foram concatenados utilizando o servidor FaBox (<http://www.birc.au.dk/software/fabox/>, Villesen, 2007), utilizando a ferramenta “Fasta alignment joiner”. Para inferência bayesiana o modelo inicial de evolução dos hospedeiros analisado foi definido (GTR+G+I) através do programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Análise de inferência Bayesiana dos hospedeiros também foi implementada com o programa BEAST 1.8.0 (Drummond et al., 2012). Os valores de probabilidades posteriores foram estimados através de quatro corridas independentes com 100 milhões de gerações, amostradas a cada 10.000 gerações, taxa evolutiva usada para espécies hospedeiras foi de 0,93% Ma (Montoya-Burgos, 2003) e modelo “yule process” (Gernhard, 2008).

Tabela 5. Identificação das espécies hospedeiras de Pimelodidae utilizadas como grupo externo na análise filogenética e disponíveis no GenBank.

Hospedeiros	GenBank
<i>Brachyplatystoma filamentosum</i> (Lichtenstein, 1819)	JF898522
<i>Parapimelodus valenciennis</i> (Lütken, 1874)	JF898552
<i>Pinirampus pirinampu</i> (Spix et Agassiz, 1829)	JF898530
<i>Pseudoplatystoma magdaleniatum</i> Buitrago-Suárez et Burr, 2007	GU593155
<i>Rhamdia quelen</i> (Quoy et Gaimard, 1824)	AY036744

Interações ecológicas

As interações ecológicas entre as espécies de Gyrodactylidae e seus hospedeiros foram analisadas considerando os valores de prevalência das associações. Esses valores foram calculados conforme proposto por Bush et al. (1997). Foram utilizadas informações de 1.113 espécimes de girodactilídeos e 765 espécimes de hospedeiros.

As interações ecológicas foram desenhadas com base na filogenia gerada para as espécies Gyrodactylidae (plotadas na horizontal) sobre a filogenia de seus hospedeiros (vertical). Apenas as espécies de parasito e hospedeiro que tiveram seu DNA amplificado com sucesso foram incluídas nas redes. Os valores de prevalência das espécies não incluídas na rede foram discutidos ao longo do texto. Para cada microbacia, foi produzida uma rede de interação para melhor visualização da composição e compartilhamento da fauna aquática da Baía de Paranaguá separadamente. A microbacia do rio Guaraguaçu foi representada pelo rio Brejatuba; a microbacia do rio Sagrado pelos rios Sagrado e do Meio; a microbacia do rio Nhundiaquara pelos rios Marumbi, do Pinto e Passa Sete; microbacia do rio Cacatu, pelos rios Cacatu e do Nunes; microbacia do rio Cachoeira pelos rios Saci e Mergulhão; microbacia do rio Tagaçaba pelos rios Capivari e Tagaçaba; microbacia do rio Serra Negra pelos rios Bananal e Pederneiras e microbacia do rio Guaraqueçaba pelo rio Morato.

A visualização dos módulos de interações do sistema hospedeiro-parasito da Baía de Paranaguá foi medida pelo algoritmo de Dormann & Strauss (2014), utilizando o programa “R” (R Development Core Team, 2011), usando o pacote “Bipartite” (Dormann et al., 2009). Uma matriz de presença e ausência de interações, foi inferida contendo informações de espécies do nível trófico inferior (hospedeiros) em linhas, e espécies de nível trófico superior (parasitos) em colunas. A medida baseia-se na abordagem gráfica aleatória de Clauset, Moore e Newman (2008), que constrói um dendograma agrupando espécies que interagem entre si. Cada módulo pode ou não realizar interações entre eles. O algoritmo troca aleatoriamente ramos em qualquer nível e avalia se o novo gráfico é mais parcimonioso do que o anterior, registrando e atualizando o melhor gráfico.

Os valores de abundância do número total de cada parasito em uma associação foram inferidos em uma matriz contendo as espécies de nível trófico inferior (hospedeiros) em linhas, e as espécies de nível trófico superior (parasitos) em colunas, para calcular o índice de especialização da rede (H_2' - índice normalizado). Essa medida descreve o índice das frequências normalizadas de especialização ou de seletividade de toda uma rede bipartida, revelando em que medida as interações observadas desviam-se do esperado, dada a soma marginal das espécies. Quanto mais seletiva uma espécie, maior é o valor para a rede. Os valores de H_2' podem variar

entre 0 (que indica uma rede sem especialização) e 1 (indicando uma rede com especialização completa) (Blüthgen et al., 2006, 2008). Os valores foram inferidos no programa “R” (R Development Core Team, 2011), usando o pacote “Bipartite” (Dormann et al., 2009).

Análise de regressão foi realizada no software PAST (Paleontological Statistics) (Hammer et al., 2001) utilizando as variáveis de riqueza de hospedeiros por microbacia e valores de índice de especialização (H_2') obtidos para cada sistema hospedeiro-parasito, com o intuito de avaliar o quanto o número de espécies de hospedeiros por microbacia influencia no índice de especificidade de cada sistema, considerando que os sistemas apresentam redes de tamanho distintos.

Reconstrução Histórica

As filogenias geradas no presente estudo para as espécies de hospedeiro e parasitos tiveram seu grupo externo retirado e em seguida os cladogramas de hospedeiros e parasitos foram submetidos ao PACT (Phylogenetic Analysis for Comparing Trees; Wojcichi & Brooks, 2004; 2005), um algoritmo que combina informações de cladogramas. PACT utiliza todas as informações filogenéticas dos cladogramas das espécies, sem a modificação de dados e aplicações de pesos, produzindo um cladograma final consistente com todas as relações filogenéticas utilizadas nos cladogramas de entrada da análise (*Assumption 0*, ver Brooks et al. 2004). Esse método considera não só casos de co-especiação, especiação simpátrica, e extinção, mas também expansões da gama de hospedeiros, especiação por isolamento periférico (troca de hospedeiro) e relacionamento de hospedeiros reticulados. Ao combinar as informações parciais de cada um dos muitos cladogramas, podemos reconstruir partes substanciais do registro coevolutivo do sistema estudado. O algoritmo é executado manualmente, pois não há software desenvolvido para sua aplicação.

O primeiro passo para iniciar a aplicação do algoritmo consiste em substituir os nomes das espécies de parasito pelos hospedeiros em que ocorrem. Em seguida, é necessário escolher o primeiro cladograma. De acordo com Wojcicki e Brooks (2004; 2005), qualquer árvore pode ser selecionada nesse momento, não alterando o resultado da árvore concatenada. No entanto, os autores sugerem começar pelo cladograma mais complexo para facilitar a obtenção do produto final. Nesse estudo,

trabalhamos com três árvores, a árvore resultante da análise filogenética dos hospedeiros, utilizando apenas as espécies foco do estudo, a segunda árvore foi adquirida do clado originado pelas espécies de *Phanerothecium* e *Onychogyrodactylus* da análise filogenética dos Gyrodactylidae e a terceira o clado formado pelas espécies de *Aglaigyrodactylus*. Apenas os girodactilídeos ovíparos foram inseridas na análise do PACT por apresentarem maior número de espécies e maior abrangência de hospedeiros.

O cladograma final do PACT foi reproduzido no programa Mesquite v.2.7.5 (Maddison & Maddison, 2011, disponível em <http://mesquiteproject.org>), cada ramo terminal com associações compartilhadas foi separado para melhor comparação com um cladograma reproduzido com informações de área (microbacias do Oeste e Norte da Baía de Paranaguá) respeitando as mesmas informações filogenéticas. O algoritmo de Liebermann (2000, 2003 a,b) foi aplicado para revelar os padrões de distribuição geográfica/hospedeiro e processos evolutivos associados a eventos de isolamento e expansão.

Uma rede ancestral do sistema hospedeiro-parasito da Baía de Paranaguá e para cada uma das sub-bacias (Baía de Guaraqueçaba e Baía de Antonina) foram reconstruídas com informações resultantes da análise de PACT e das redes de interações ecológicas atuais. As redes ancestrais foram reconstruídas conforme proposta de Tschá (2016), na distribuição das associações parasitos e hospedeiros e na história da associação conforme proposta pelo PACT. Associações presentes em ambas grandes unidades de microbacias (Oeste e Norte) foram consideradas como pré-existentes no sistema resultante da confluência de todas as bacias hidrográficas durante o período putativo de expansão (até 10.000 anos atrás). As redes ancestrais hipotetizadas para as regiões do Norte e Oeste seguiram o mesmo princípio. Em todas as reconstruções não foram incluídas associações postuladas como expansão do espectro ou troca de hospedeiros recentes e locais (i.e. que ocorreram em uma única microbacia após fragmentação do sistema – período de isolamento)

Esses resultados foram combinados com datações de eventos de transgressões e regressões marinhas (Suguio et al., 1985, Shackleton, 1987, Martin et al., 1996, Siddall et al., 2003; Miller et al., 2011).

III. Resultados

Diversidade e distribuição de hospedeiros

Um total de oito espécies de peixes hospedeiros foram coletadas nos 15 rios analisados. A grande maioria das espécies são representantes de Loricariidae (Siluriformes) (Tabela 6). Apenas duas espécies pertencem a famílias diferentes, uma de Callichthyidae (Siluriformes) e outra de Characidae (Characiformes). A identidade e distribuição das espécies hospedeiras utilizadas no presente estudo estão disponíveis na Tabela 6, juntamente com informações a qual subfamília esses pertencem e número total coletado de cada hospedeiro em cada rio/microbacia.

Ancistrus multispinis (Regan, 1912) foi encontrado em cinco das oito microbacias amostradas nesse estudo. Essa espécie hospedeira esteve presente em sete dos 15 rios e ausente em oito. Esse hospedeiro foi melhor representado no rio Tagaçaba. A espécie hospedeira *Kronichthys lacerta* (Nichols, 1919) foi coletada em seis microbacias, totalizando oito rios e esteve ausente em sete. Esse hospedeiro foi amostrado com maior frequência nos rios Morato e Mergulhão. *Pareiorhaphis* cf. *azygolechis* (Pereira et Reis, 2002) foi encontrado apenas no rio Brejatuba (microbacia do rio Guaraguaçu) apresentando a menor distribuição geográfica desse estudo. A espécie hospedeira *Pareiorhaphis splendens* (Bizerril, 1995) foi encontrada em quatro microbacias, representando seis rios. Esse hospedeiro foi mais frequente no rio do Nunes (microbacia do rio Cacatu) e Marumbi (microbacia do rio Nhundiaquara). *Rineloricaria* sp. foi a espécie com maior distribuição geográfica no presente estudo, sendo encontrada em sete microbacias, totalizando onze rios, estando ausente em apenas quatro. A maior número de espécimes foi encontrada nos rios Sagrado (microbacia do rio Sagrado), do Pinto (microbacia do rio Nhundiaquara) e Morato (Microbacia do rio Guaraqueçaba). A espécie hospedeira *Schizolecis guntheri* (Miranda Ribeiro, 1918) foi encontrada em apenas dois rios/microbacias, rio do Nunes (microbacia do rio Cacatu) e rio Capivari (microbacia do rio Tagaçaba), em ambos os rios apresentou baixa representação de espécimes. *Scleromystax barbatus* (Quoy et Gaimard, 1824) e *Mimagoniates microlepis* (Steindachner, 1877) apresentaram a mesma distribuição geográfica nos rios e microbacias amostradas. Esses hospedeiros foram encontrados em seis microbacias, totalizando dez rios e estavam ausentes em cinco. As duas espécies hospedeiras apresentaram maior representação no rio do Pinto (microbacia do rio Nhundiaquara).

Tabela 6. Número de espécimes coletados de cada hospedeiro em cada rio/microbacia o presente estudo, com informações da subfamília a que pertencem.

Hospedeiros	Subfamília	Guaraguaçu	Sagrado		Nhundiaquara			Cacatu	
		Brejatuba	Sagrado	Meio	Marumbi	Pinto	Passa Sete	Cacatu	do Nunes
<i>Ancistrus multispinis</i>	Ancistrinae				4				3
<i>Kronichthys lacerta</i>	Neoplecostominae				2			4	
<i>Pareiorhaphis</i> cf. <i>azygolechis</i>	Neoplecostominae	25							
<i>Pareiorhaphis splendens</i>	Neoplecostominae				17			1	19
<i>Rineloricaria</i> sp.	Loricariinae		39		28	39	17	27	4
<i>Schizolecis guntheri</i>	Hypoptopomatinae								1
<i>Scleromystax barbatus</i>	Corydoradinae		29	11	52	55	13	6	16
<i>Mimagoniates microlepis</i>	Stevardiinae		9	19	17	36	2	24	8

Continua		Guaraqueçaba	Cachoeira		Serra Negra		Tagaçaba	
		Morato	Mergulhão	Saci	Bananal	Pederneiras	Capivari	Tagaçaba
<i>Ancistrus multispinis</i>	Ancistrinae	5			2	3	1	11
<i>Kronichthys lacerta</i>	Neoplecostominae	15	10		8	4	5	3
<i>Pareiorhaphis</i> cf. <i>azygolechis</i>	Neoplecostominae							
<i>Pareiorhaphis splendens</i>	Neoplecostominae		2	7	2			
<i>Rineloricaria</i> sp.	Loricariinae	38	2		22		5	5
<i>Schizolecis guntheri</i>	Hypoptopomatinae						2	
<i>Scleromystax barbatus</i>	Corydoradinae	10			28		8	
<i>Mimagoniates microlepis</i>	Stevardiinae	32			2		2	

Diversidade de Gyrodactylidae

Foram identificadas 22 espécies de Gyrodactylidae dentre os 9.316 parasitos recuperados da superfície corporal dos peixes hospedeiros (771 indivíduos). A análise da superfície corporal desses hospedeiros detectou 409 indivíduos parasitados por espécies de Gyrodactylidae e 362 não parasitados. Das oito espécies hospedeiras analisadas no presente estudo, 26 espécimes de *A. multispinis* estavam parasitados e apenas 1 negativo, *K. lacerta* (50 positivos e 1 negativo), *P. cf. azygolechis* (22 positivos e 3 negativos), *P. splendens* (44 positivos e 4 negativos), *Rineloricaria* sp. (167 positivos e 58 negativos) *S. guntheri* (1 positivo e 2 negativos), *S. barbatus* (73 positivos e 155 negativos) e *M. microlepis* (16 positivos e 134 negativos). Não foi possível identificar pelo procedimento molecular e taxonômico 12 espécimes de peixes hospedeiros, dentre esses, 10 estavam positivos e 2 negativos. Esses indivíduos não foram utilizados nas análises.

Esse estudo identificou 17 espécies de Gyrodactylidae ovíparos e 5 espécies representando o clado vivíparo. Cinco das espécies ovíparas foram identificadas como novas espécies para *Phanerothecium* e três novas espécies para *Aglaioogyrodactylus*. Para o clado vivíparo foram identificadas três novas espécies de *Gyrodactylus* e uma nova espécie de *Anacanthocotyle*.

A espécie hospedeira *A. multispinis* apresentou riqueza de quatro espécies de girodactilídeos ovíparos (Figura 2). *Aglaioogyrodactylus* sp. n. 4, foi identificada ocorrendo nesse hospedeiro apenas na microbacia do rio Guaraqueçaba. As espécies *Onychogyrodactylus hydaticus* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007 e *Onychogyrodactylus sudis* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007, foram encontradas nesse hospedeiro em todas as microbacias em que este estava presente. *Phanerothecium* sp. n. 5 foi identificado apenas nas microbacias do rio Nhundiaquara e Cacatu.

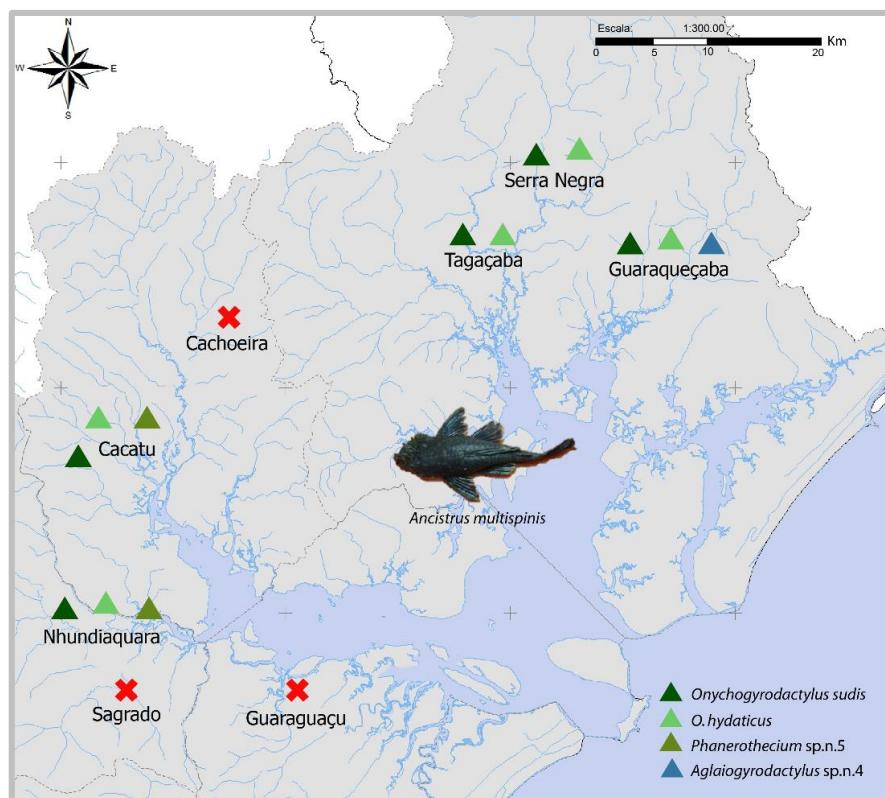


Figura 2. Ilustração da riqueza de espécies de Gyrodactylidae encontradas em *A. multispinis*. Os triângulos coloridos representam as diferentes espécies de girodactilídeos identificadas nesse hospedeiro. O “x” indica a(s) microbacia(s) em que esse hospedeiro não foi encontrado.

Kronichthys lacerta apresenta riqueza de cinco espécies ovíparas de Gyrodactylidae (Figura 3). A composição de girodactilídeos desse hospedeiro nas microbacias do rio Nhundiaquara, Cacatu e Tagaçaba foi de apenas uma espécie (*A. forficuloides*). Esse girodactilídeo foi identificado também nas microbacias do rio Cachoeira, Serra Negra e Guaraqueçaba. *Aglaiogyrodactylus forficulatus* ocorreu nas microbacias dos rios Cachoeira, Tagaçaba, Serra negra e Guaraqueçaba. A composição de girodactilídeos na microbacia do rio Serra Negra para esse hospedeiro foi inclui também *Phanerothecium* sp. n. 4 e *Aglaiogyrodactylus pedunculatus* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007. Na microbacia do rio Guaraqueçaba foi identificado ainda *Phanerothecium* sp. n. 3.

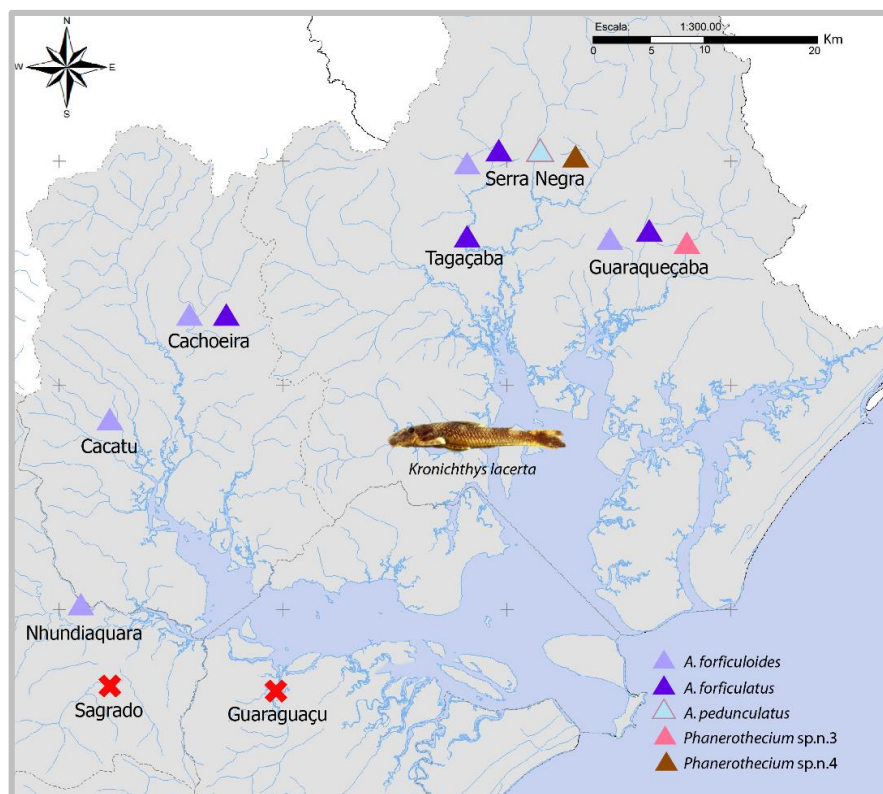


Figura 3. Ilustração da riqueza de espécies de Gyrodactylidae encontradas em *K. lacerta*. Os triângulos coloridos representam as diferentes espécies de girodactilídeos identificadas nesse hospedeiro. O “x” indica a(s) microbacia(s) em que esse hospedeiro não foi encontrado.

A riqueza de girodactilídeos para *P. cf. azygolechis* (Figura 4) foi de quatro espécies, todas representando espécies ovíparas da família. Dentre elas, três são novas espécies: *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 2, *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 4 e *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 6, além de *Aglaiogyrodactylus coneii* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007. Esse hospedeiro foi encontrado apenas na microbacia do rio Guaraguaçu.

A espécie hospedeira *P. splendens* foi parasitada por apenas uma espécie de Gyrodactylidae na microbacia rio Nhundiaquara (*Aglaiogyrodactylus ctenistus* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007). As espécies *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 4 e *A. forficuloides* foram encontradas nesse hospedeiro nas microbacias do rio Cacatu e rio Cachoeira. *Gyrodactylus* sp. n. 5/8 (identificadas no primeiro capítulo da tese como sendo a mesma espécie), uma espécie de girodactilídeo vivíparo, foi registrada nas microbacias do rio Cacatu e rio Serra Negra. Nessa última microbacia, *Aglaiogyrodactylus salebrosus* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007 foi identificada nesse hospedeiro. Na microbacia do rio Cacatu, foi detectada a ocorrência de *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 6 e na microbacia do Cachoeira *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 2.

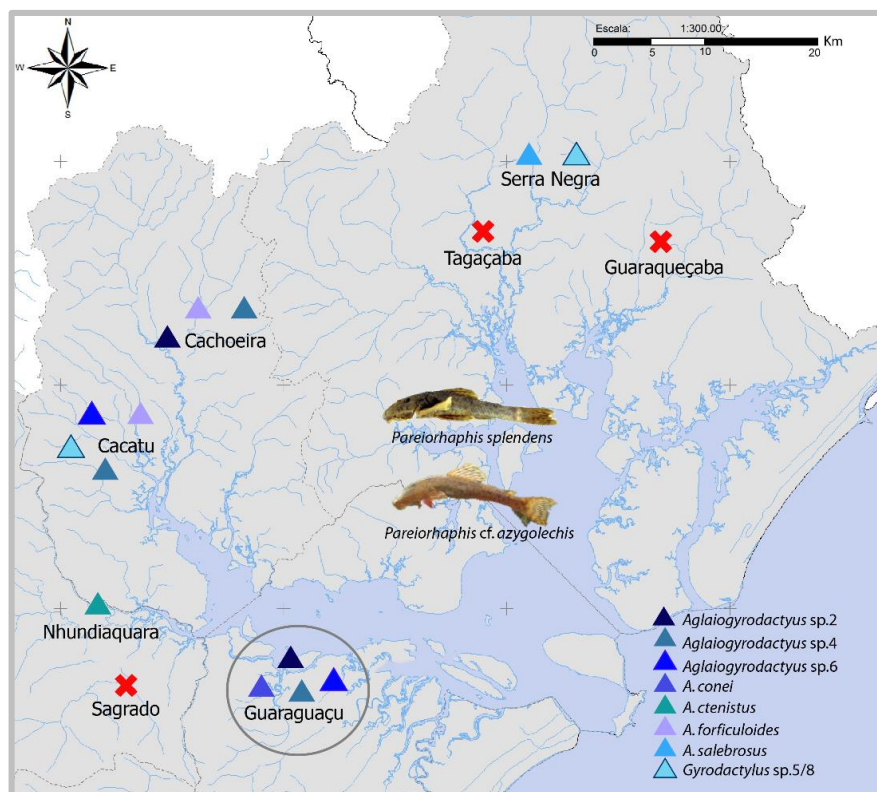


Figura 4. Ilustração da riqueza de espécies de Gyrodactylidae encontradas em *P. cf. azygolechis* e *P. splendens*. Os triângulos coloridos representam as diferentes espécies de girodactilídeos identificadas nesses hospedeiros. O "x" indica a(s) microbacia(s) em que esses hospedeiros não foram encontrados. Na microbacia do rio Guaraguaçu foi encontrada apenas *P. cf. azygolechis*. Nas demais microbacias foram encontrados apenas indivíduos de *P. splendens*.

Foram identificadas seis espécies de girodactilídeos ovíparos em *Rineloricaria* sp. (Figura 5). Não foi possível identificar morfologicamente os espécimes encontrados nesse hospedeiro na microbacia do rio Cachoeira. *Phanerothecium* sp. n. 1 e *Phanerothecium* sp. n. 2 ocorreram nesse hospedeiro praticamente nas mesmas microbacias (rio Sagrado, rio Nhundiaquara e rio Cacatu). *Phanerothecium* sp. n. 1 foi encontrado ainda na microbacia do Tagaça. A espécie *Phanerothecium* sp. n. 3 foi identificada nas microbacias dos rios Nhundiaquara, Cacatu, Tagaça e Guaraqueçaba. Na microbacia do rio Tagaça, Serra Negra e Guaraqueçaba foi identificada ainda a espécie *Phanerothecium* sp. n. 4 ocorrendo nesse hospedeiro. A microbacia do rio Guaraqueçaba foi composta ainda por: *Aglaiogyrodactylus forficuloides* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007 e *Aglaiogyrodactylus forficulatus* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007.

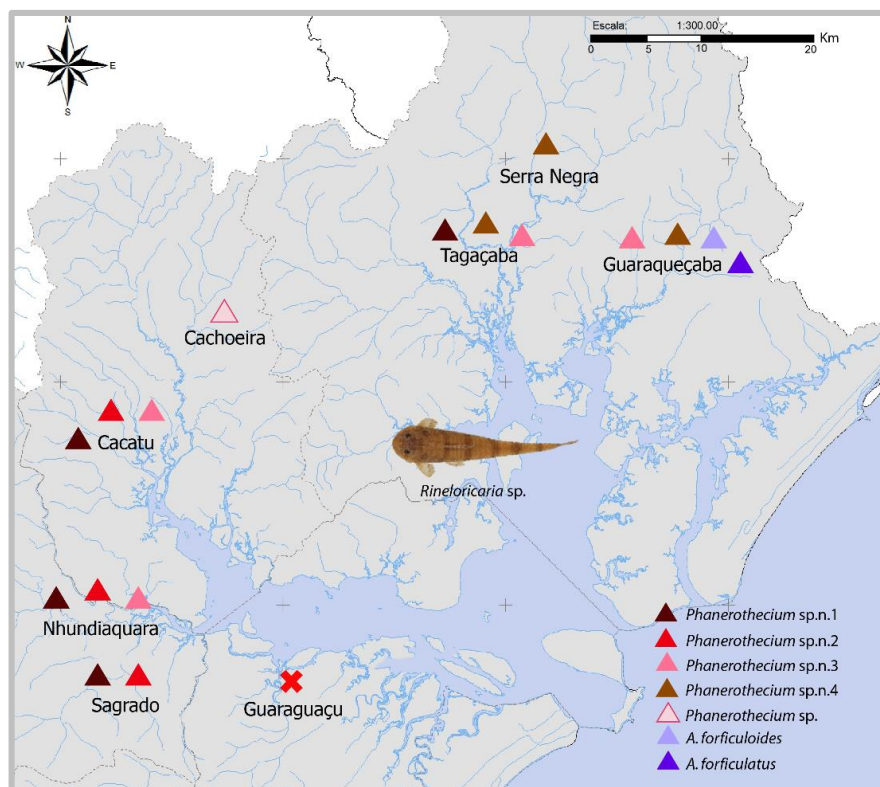


Figura 5. Ilustração da riqueza de espécies de Gyrodactylidae encontradas em *Rineloricaria* sp.. Os triângulos coloridos representam as diferentes espécies de girodactilídeos identificadas nesse hospedeiro. O “x” indica a(s) microbacia(s) em que esse hospedeiro não foi encontrado.

Schizolecis guntheri foi coletada apenas nas microbacias do rio Cacatu e rio Tagaçaba (Figura 6). Entretanto não foi possível identificar morfologicamente girodactilídeos na microbacia do rio Cacatu. *Aglaogyrodactylus guttus* Kritsky, Vianna et Boeger, 2007 foi identificado ocorrendo nesse hospedeiro na microbacia do rio Tagaçaba.

Scleromystax barbatus foi compartilhado por apenas duas espécies de girodactilídeos (Figura 7). *Gyrodactylus scleromystaci* Bueno-Silva et Boeger, 2014 foi encontrado parasitando esse hospedeiro nas microbacias do rio Sagrado, Nhundiaquara, Cacatu, Serra Negra e Guaraqueçaba. Não foi possível identificar os espécimes de Gyrodactylidae na microbacia do Tagaçaba. *Gyrodactylus* sp. n. 4 ocorreu nesse hospedeiro apenas na microbacia do rio Sagrado.

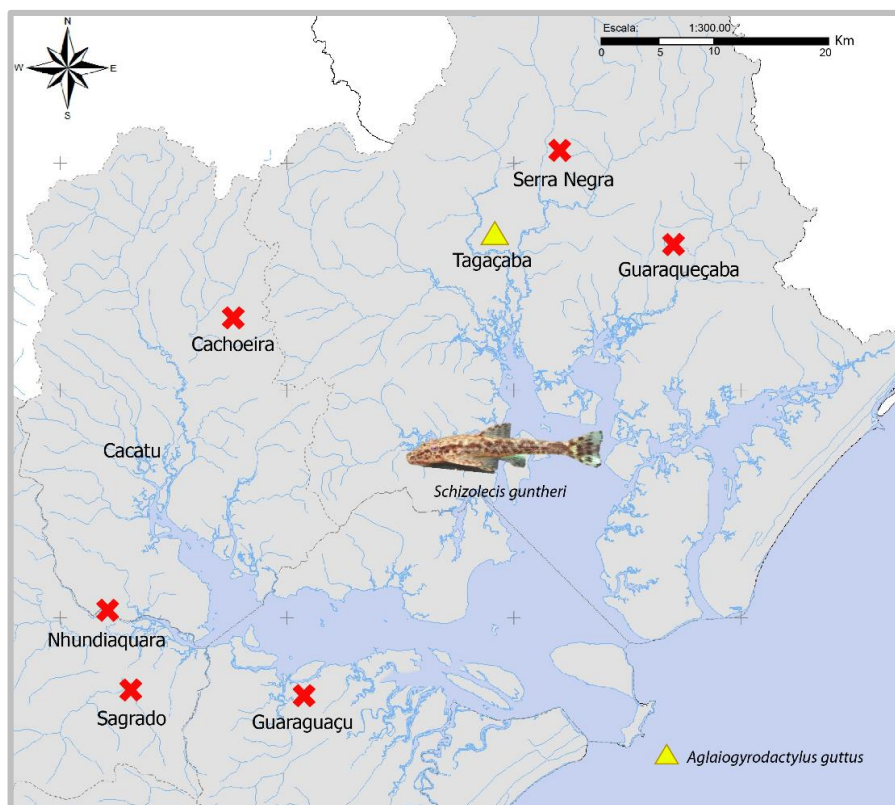


Figura 6. Ilustração da riqueza de espécies de Gyrodactylidae encontradas em *S. guntheri*. Os triângulos coloridos representam as diferentes espécies de girodactilídeos identificadas nesse hospedeiro. O “x” indica a(s) microbacia(s) em que esse hospedeiro não foi encontrado. A microbacia sem triângulos ou “x” indica a presença do hospedeiro, mas a ausência de girodactilídeos.

Foram identificadas apenas duas espécies de girodactilídeo em *Mimagoniates microlepis* (Figura 8). A espécie *Gyrodactylus* sp. n. 9 foi encontrada parasitando esse hospedeiro nas microbacias do rio Sagrado, Nhundiaquara, Cacatu e Tagaçaba. *Anacanthocotyle* sp. n. 1 foi identificado nas microbacias do rio Sagrado e Cacatu. Não foi possível identificar os espécimes de Gyrodactylidae encontrados na microbacia do rio Guaraqueçaba. Na microbacia do rio Serra Negra foi encontrado esse hospedeiro, porém não foi encontrado nenhum girodactilídeo.

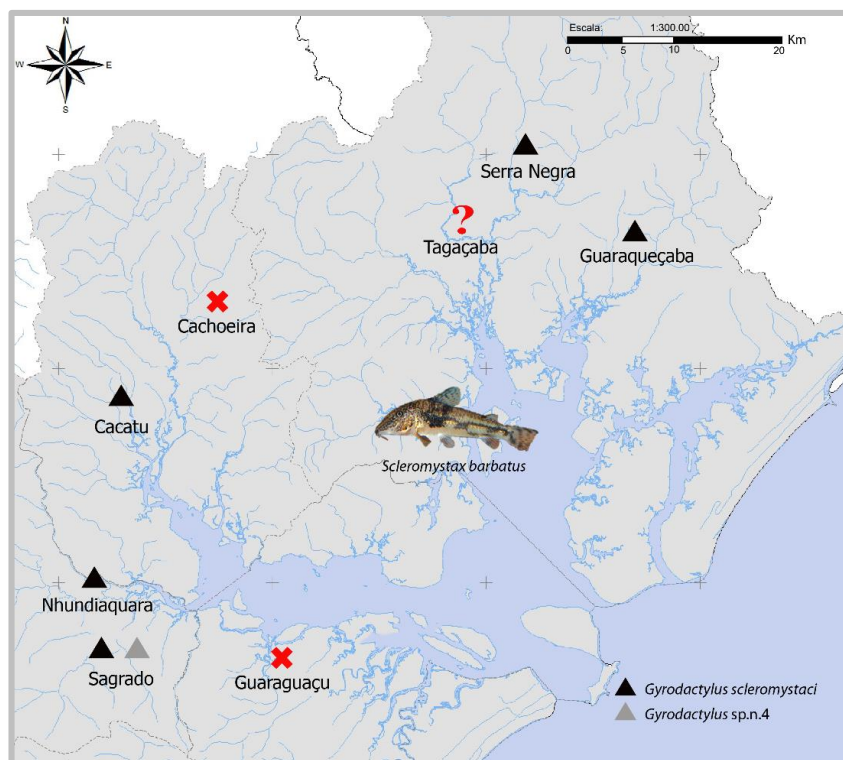


Figura 7. Ilustração da riqueza de espécies de Gyrodactylidae encontradas em *S. barbatus*. Os triângulos coloridos representam as diferentes espécies de girodactilídeos identificadas nesse hospedeiro. O “x” indica a(s) microbacia(s) em que esse hospedeiro não foi encontrado. A interrogação indica a presença do hospedeiro, mas a não identificação do girodactilídeo.

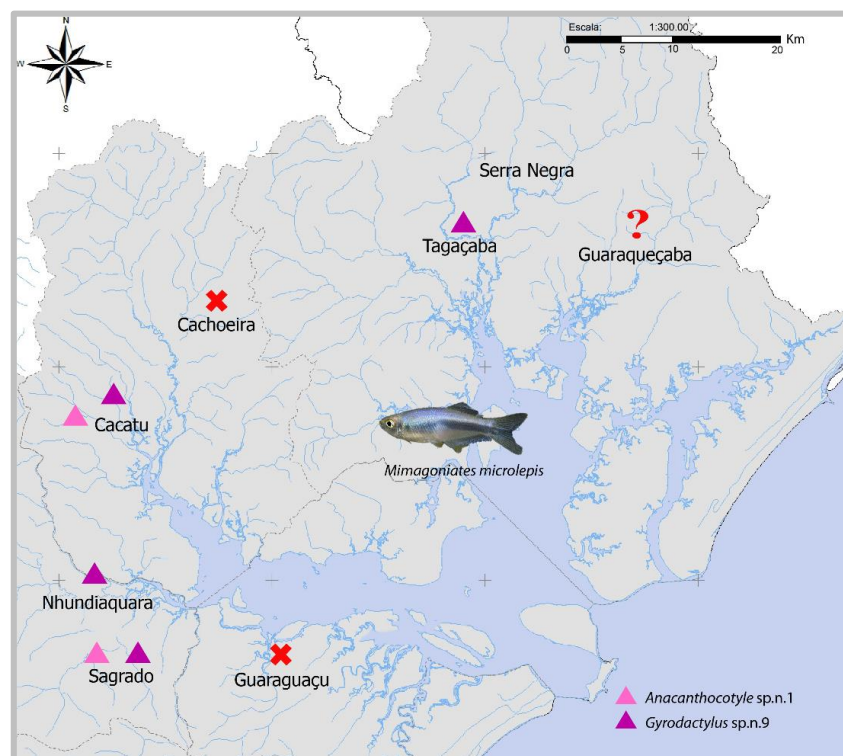


Figura 8. Ilustração da riqueza de espécies de Gyrodactylidae encontradas em *M. microlepis*. Os triângulos coloridos representam as diferentes espécies de girodactilídeos identificadas nesse hospedeiro. O “x” indica a(s) microbacia(s) em que esse hospedeiro não foi encontrado. A microbacia que sem triângulos ou “x” indica a presença do hospedeiro, mas a ausência de girodactilídeos. A interrogação indica a presença do hospedeiro, mas a não identificação do girodactilídeo.

Associações hospedeiros-parasitos: parâmetros ecológicos

As interações entre todas as espécies de Gyrodactylidae e seus hospedeiros em cada microbacia estão apresentadas na Tabela 7, juntamente com os valores de abundância média e prevalência.

Tabela 7. Interação entre espécies de parasito e hospedeiro em cada microbacia da planície costeira do Paraná, com valores de abundância média (*Abd*) e prevalência (*Prev*).

	Parasito	Abd	Prev	Hospedeiros
Guaraguaçu	<i>Aglaiogyrodactylus coneii</i>	1,60	0,60	
	<i>Aglaiogyrodactylus</i> sp. n. 2	0,08	0,04	<i>Pareiorhaphis</i> cf. <i>azygolechis</i>
	<i>Aglaiogyrodactylus</i> sp. n. 4	0,08	0,04	
	<i>Aglaiogyrodactylus</i> sp. n. 6	0,08	0,08	
Sagrado	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 1	0,12	0,10	<i>Rineloricaria</i> sp.
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 2	2,12	0,35	
	<i>Anacanthocotyle</i> sp.1	0,07	0,07	<i>Mimagoniates microlepis</i>
	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 9	0,25	0,10	
	<i>Gyrodactylus scleromystaci</i>	0,25	0,15	<i>Scleromystax barbatus</i>
	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 4	0,02	0,02	
Nhundiaquara	<i>Aglaiogyrodactylus ctenistus</i>	3,41	0,94	<i>Pareiorhaphis splendens</i>
	<i>Aglaiogyrodactylus forficuloides</i>	7,50	1	<i>Kronichthys lacerta</i>
	<i>Onychogyrodactylus hydaticus</i>	0,75	0,25	
	<i>Onychogyrodactylus sudis</i>	5,75	0,50	<i>Ancistrus multispinis</i>
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 5	0,25	0,25	
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 1	0,19	0,03	
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 2	0,58	0,16	<i>Rineloricaria</i> sp.
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 3	0,02	0,02	
	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 9	0,09	0,07	<i>Mimagoniates microlepis</i>
	<i>Gyrodactylus scleromystaci</i>	0,22	0,13	<i>Scleromystax barbatus</i>
Cacatu	<i>Onychogyrodactylus hydaticus</i>	1,66	0,66	
	<i>Onychogyrodactylus sudis</i>	7,33	1	<i>Ancistrus multispinis</i>
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 5	0,33	0,33	
	<i>Aglaiogyrodactylus forficuloides</i>	0,15	0,05	
	<i>Aglaiogyrodactylus</i> sp. n. 4	0,40	0,20	<i>Pareiorhaphis splendens</i>
	<i>Aglaiogyrodactylus</i> sp. n. 6	0,25	0,15	
	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 5/8	2,50	0,60	
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 1	0,19	0,03	
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 2	0,12	0,06	<i>Rineloricaria</i> sp.
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 3	0,03	0,03	
	Negativo			<i>Schizolecis guntheri</i>
	<i>Anacanthocotyle</i> sp. n. 1	0,03	0,03	
	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 9	0,03	0,03	<i>Mimagoniates microlepis</i>
	<i>Gyrodactylus scleromystaci</i>	0,09	0,09	<i>Scleromystax barbatus</i>
	<i>Aglaiogyrodactylus forficuloides</i>	5,75	1	<i>Kronichthys lacerta</i>
	<i>Aglaiogyrodactylus pedunculatus</i>	6	1	Loricariidae não identificado
Cachoeira	<i>Aglaiogyrodactylus forficuloides</i>	0,10	0,10	
	<i>Aglaiogyrodactylus</i> sp. n. 2	2,11	0,60	<i>Pareiorhaphis splendens</i>
	<i>Aglaiogyrodactylus</i> sp. n. 4	1,50	0,60	
	<i>Aglaiogyrodactylus forficulatus</i>	0,30	0,20	
	<i>Aglaiogyrodactylus forficuloides</i>	3,70	0,80	<i>Kronichthys lacerta</i>
	<i>Phanerothecium</i> sp.	2	0,50	<i>Rineloricaria</i> sp.

	Continua		
Tagaçaíba	<i>Onychogyrodactylus hydaticus</i>	2,75	0,90
	<i>Onychogyrodactylus sudis</i>	2,75	0,90
	<i>Aglaigyrodactylus forficulatus</i>	5,75	1
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 1	0,80	0,40
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 3	0,10	0,10
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 4	2	0,70
	<i>Aglaigyrodactylus guttus</i>	0,50	0,50
	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 9	0,50	0,50
	Gyrodactylidae não identificado		
	<i>Aglaigyrodactylus forficulatus</i>	2,25	0,50
Serra Negra	<i>Onychogyrodactylus hydaticus</i>	1,60	0,80
	<i>Onychogyrodactylus sudis</i>	4,80	1
	<i>Aglaigyrodactylus forficulatus</i>	6,83	1
	<i>Aglaigyrodactylus forficuloides</i>	0,33	0,25
	<i>Aglaigyrodactylus pedunculatus</i>	0,16	0,16
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 4	0,08	0,08
	<i>Aglaigyrodactylus salebrosus</i>	0,50	0,50
	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 5/8	2	1
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 4	2,50	0,90
	Negativo		
	<i>Gyrodactylus scleromystaci</i>	0,03	0,03
	<i>Aglaigyrodactylus forficulatus</i>	10	1
	<i>Aglaigyrodactylus forficuloides</i>	0,50	0,50
Guaraqueçaba	<i>Onychogyrodactylus hydaticus</i>	0,20	0,20
	<i>Onychogyrodactylus sudis</i>	5,80	0,80
	<i>Aglaigyrodactylus</i> sp. n. 4	0,20	0,20
	<i>Aglaigyrodactylus forficulatus</i>	4,70	0,80
	<i>Aglaigyrodactylus forficuloides</i>	0,73	0,33
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 3	0,06	0,06
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 3	1,02	0,18
	<i>Phanerothecium</i> sp. n. 4	0,34	0,13
	<i>Aglaigyrodactylus forficulatus</i>	0,05	0,02
	<i>Aglaigyrodactylus forficuloides</i>	0,02	0,02
	Gyrodactylidae não identificado		
	<i>Gyrodactylus scleromystaci</i>	0,10	0,10
	<i>Aglaigyrodactylus forficulatus</i>	13	0,50
	<i>Aglaigyrodactylus guttus</i>	7	0,50

Análise filogenética

A análise de relacionamento filogenético obtida com os genes concatenados para as espécies hospedeiras apresentou suporte elevado para a grande maioria dos ramos (Figura 9). A análise separou as espécies em dois clados. O primeiro clado com suporte de 100% apresentou as espécies de Pimelodidae (*P. magdaleniatum*, *B. filamentosum*, *P. valenciennis*, *P. pirinampu* e *R. quelen*), utilizadas como grupo externo. O segundo clado representado pelas espécies de Loricariidae (*Rineloricaria* sp., *A. multispinis*, *P. cf. azygolechis*, *P. splendens*, *K. lacerta*, *S. guntheri* e *H.*

leucofrenatus) foco do presente estudo e *S. barbatus*, com suporte de 100%. Apenas *H. leucofrenatus* não foi encontrada nas microbacias estudadas. *Mimagoniates microlepis*, um Characiformes, aparece com o grupo mais distante dos demais na reconstrução. *Rineloricaria* sp., mostra-se como grupo irmão de *A. multispinis*, com suporte de 73%. *Hisonotus leucofrenatus* apresenta-se como grupo irmão de *S. guntheri* + *K. lacerta* + *P. splendens* + *P. cf. azygolechis*, com suporte de 100%.

A análise de relacionamento filogenético obtida com os genes concatenados para espécies de Gyrodactylidae resultou em três clados (Figura 10). O primeiro formado pelas espécies vivíparas (*Gyrodactylus* sp. n. 5/8 e *G. scleromystaci*) com suporte de 100%. O segundo clado com suporte de 100% de probabilidade posterior, foi formado pelas espécies ovíparas de *Phanerothecium* (*Phanerothecium* sp. n. 1, *Phanerothecium* sp. n. 5, *Phanerothecium* sp. n. 4, *Phanerothecium* sp. n. 2 e *Phanerothecium* sp. n. 3), juntamente com as espécies de *Onychogyrodactylus* (*O. hydaticus* e *O. sudis*). O último clado foi formado pelas espécies de *Aglaigyrodactylus* (*A. pedunculatus*, *A. calamus*, *A. forficuloides*, *A. forficulatus*, *A. guttus*, *Aglaigyrodactylus* sp. n. 4, *A. coneii*, *A. ctenistus*, *Aglaigyrodactylus* sp. n. 6 e *Aglaigyrodactylus* sp. n. 2) com suporte de 60%.

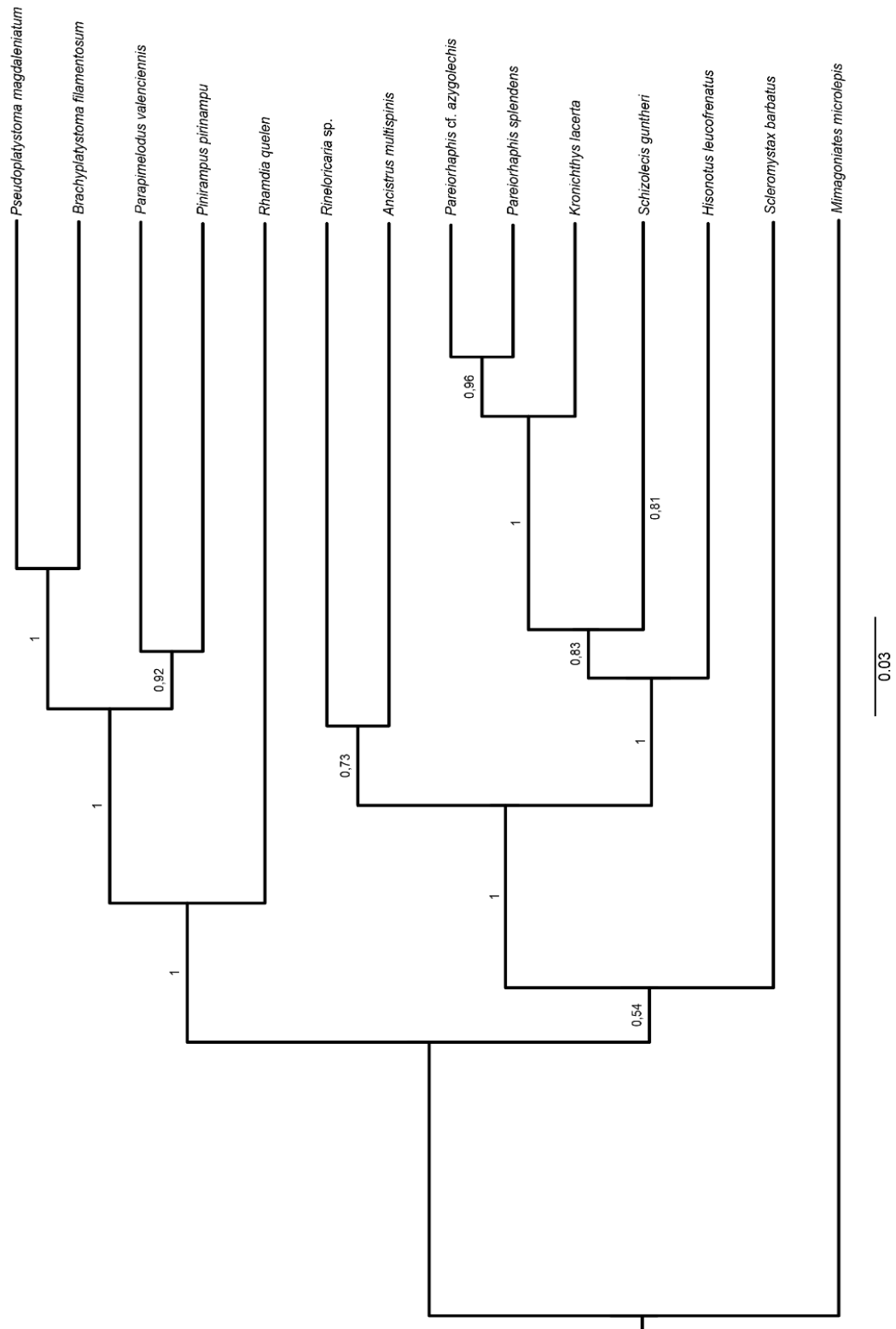


Figura 9. Relacionamento filogenético das espécies hospedeiras, baseando-se em dados moleculares concatenados (Cyt-b, COI, RH).

Redes de interações ecológicas

A análise de interação ecológica para a microbacia do rio Guaraguaçu (Rio Brejatuba) (Figura 11), mostrou que a espécie *P. cf. azygolechis* foi compartilhada por quatro espécies ovíparas de Gyrodactylidae. *Aglaiogyrodactylus coneii* apresentou maior valor de prevalência (0,60).

Na microbacia do rio Sagrado (rio Sagrado e do Meio) (Figura 12), a rede de interação mostra que *Rineloricaria* sp. apresentou a maior riqueza dentre os parasitos. Nesse hospedeiro foram encontrados 83 espécimes ovíparos de *Phanerothecium* sp. n. 2 - esse parasito representou o maior valor de prevalência (0,35) para essa microbacia. A menor prevalência para essa microbacia foi para *Gyrodactylus* sp. n. 4 (0,02 em *S. barbatus*). Esse girodactilídeo e os identificados para *M. microlepis* não estão representados na análise de rede que inclui a filogenia construída com dados moleculares. A identificação das espécies foi realizada apenas através da morfologia das estruturas esclerotizadas utilizadas para identificação. *Mimagoniates microlepis* foi parasitado pelas espécies vivíparas, *Anacanthocotyle* sp. n. 1, com prevalência igual a 0,07 e *Gyrodactylus* sp. n. 9 com prevalência de 0,10.

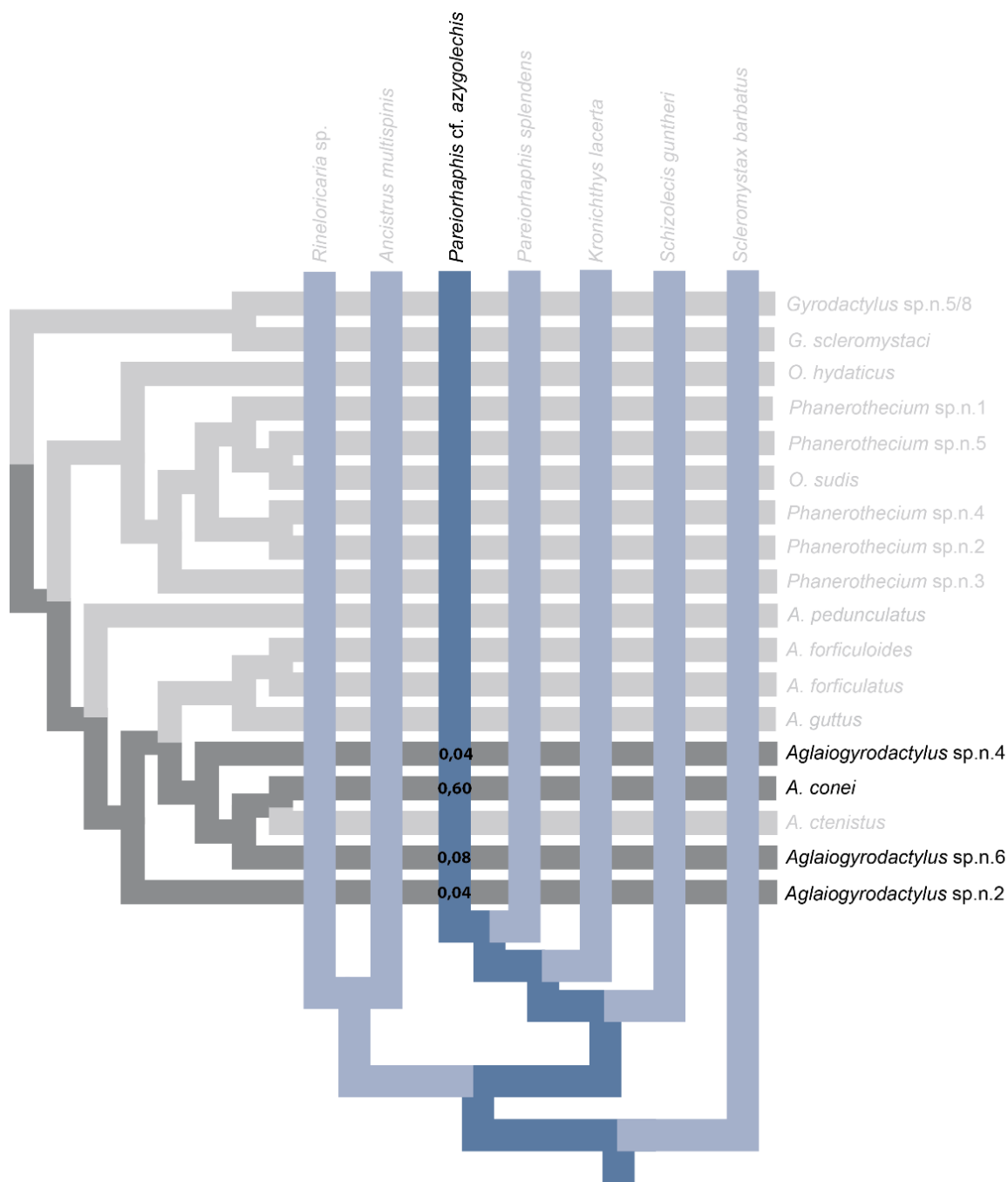


Figura 11. Representação gráfica das interações ecológicas entre as espécies de Gyrodactylidae e seus hospedeiros da microbacia do rio Guaraguaçu, com informações de prevalência de cada interação. Os peixes hospedeiros estão amostrados na filogenia vertical e os parasitos amostrados na filogenia horizontal. Os valores de prevalência representam a presença de relacionamento entre as espécies de Gyrodactylidae e de seus hospedeiros. Os ramos e nomes de espécies em tonalidade escura em cada filogenia representa a presença de cada espécie de hospedeiro e parasito na microbacia, enquanto os mais claros representam a ausência de cada espécie.

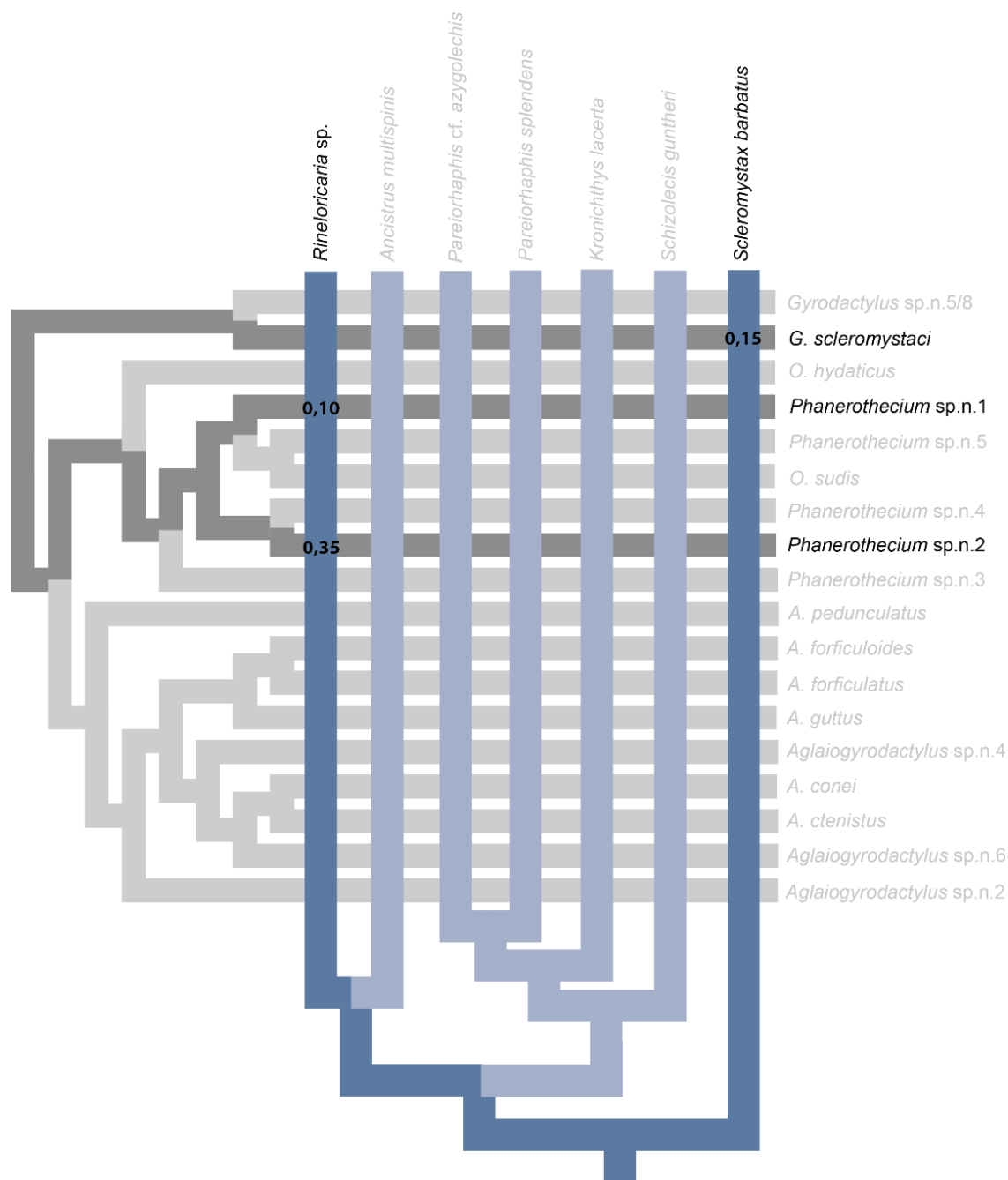


Figura 12. Representação gráfica das interações ecológicas entre as espécies de Gyrodactylidae e seus hospedeiros da microbacia do rio Sagrado, com informações de prevalência de cada interação. Os peixes hospedeiros estão amostrados na filogenia vertical e os parasitos amostrados na filogenia horizontal. Os valores de prevalência representam a presença de relacionamento entre as espécies de Gyrodactylidae e de seus hospedeiros. Os ramos e nomes de espécies em tonalidade escura em cada filogenia representa a presença de cada espécie de hospedeiro e parasito na microbacia, enquanto os mais claros representam a ausência de cada espécie.

A interação ecológica entre as espécies de Gyrodactylidae e seus hospedeiros para microbacia do rio Nhundiaquara (rio Marumbi, do Pinto e Passa Sete) (Figura 13) mostrou maior riqueza de espécies de girodactilídeos em *Rineloricaria* sp. e *A. multispinis*, os dois hospedeiros foram compartilhados por três espécies de

girodactilídeos. O maior valor de prevalência nessa microbacia foi para *A. forficuloides* (1 em *K. lacerta*) e o menor valor para *Phanerothecium* sp. n. 3 (0,02 em *Rineloricaria* sp.). Os dados morfológicos identificaram ainda, *Gyrodactylus* sp. n. 9 parasitando *M. microlepis*, com prevalência igual a 0,07.

Na microbacia do rio Cacatu (rio do Nunes e Cacatu) (Figura 14), *P. splendens* apresenta a maior riqueza de girodactilídeos; esse hospedeiro foi compartilhado por quatro espécies. O maior valor de prevalência (1,00) foi apresentado pelas espécies *O. sudis* (em *A. multispinis*) e *A. forficuloides* (em *K. lacerta*). O menor valor de prevalência (0,03) foi compartilhado por (*Phanerothecium* sp. n. 1 e *Phanerothecium* sp. n. 3 em *Rineloricaria* sp.). Os dados morfológicos identificaram ainda *Gyrodactylus* sp. n. 9 e *Anacanthocontyle* sp. n. 1 parasitando *M. microlepis* ambas com prevalência igual a 0,03. *Aglaiogyrodactylus pedunculatus* foi identificado parasitando um loricarídeo não identificado com prevalência igual a 1. Não foi encontrada nenhuma espécie parasita em *S. guntheri*.

Na análise da microbacia do rio Cachoeira (rio Saci e Mergulhão) (Figura 15), a espécie hospedeira com maior riqueza foi *P. splendens*. *Aglaiogyrodactylus forficuloides* apresentou maior valor de prevalência (0,80 em *K. lacerta*) e o menor valor (0,10 em *P. splendens*). Em *Rineloricaria* sp. foi encontrado espécimes de *Phanerothecium* ainda não identificados, com prevalência igual a 0,50.

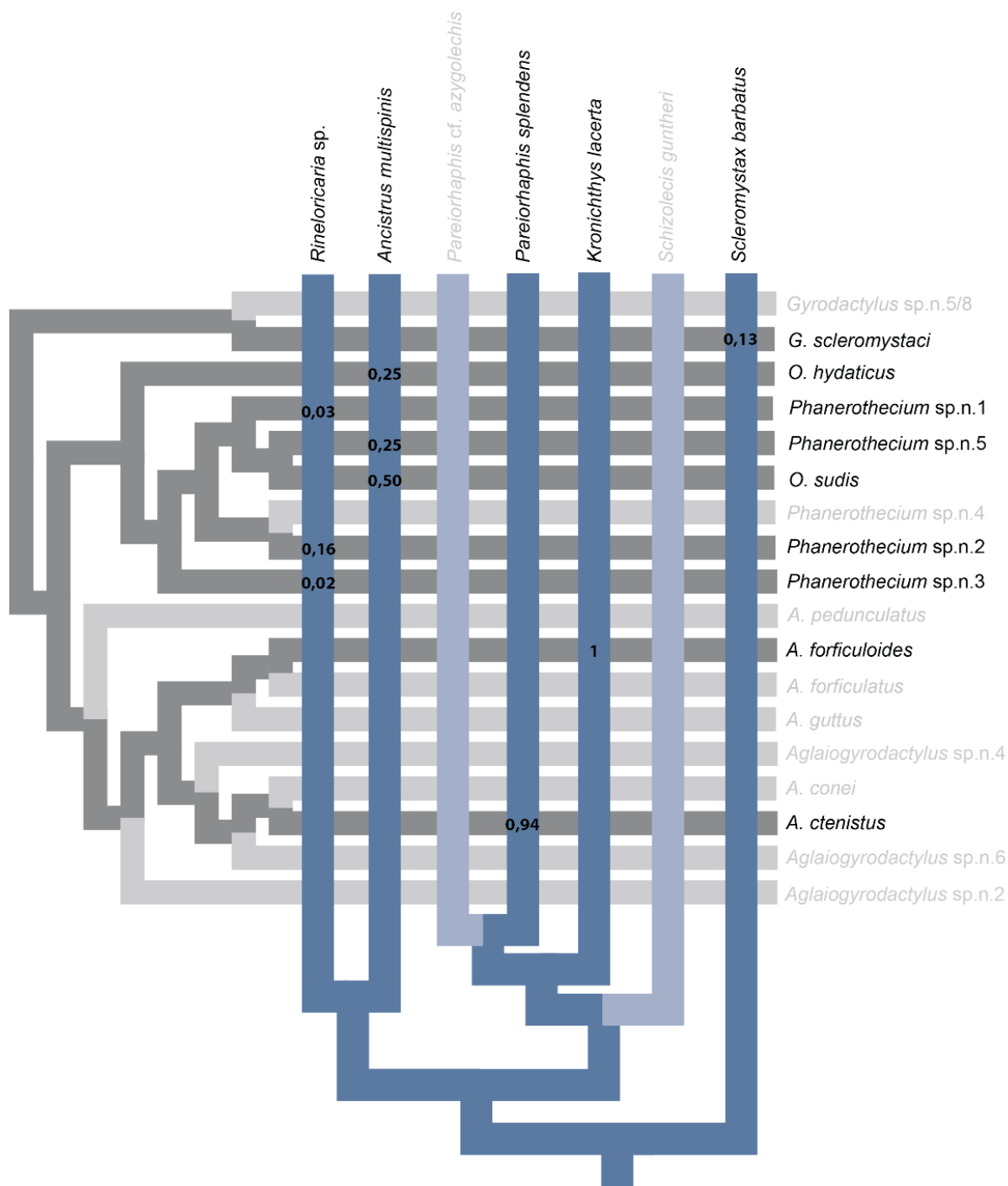


Figura 13. Representação gráfica das interações ecológicas entre as espécies de Gyrodactylidae e seus hospedeiros da microbacia do rio Nhundiaquara, com informações de prevalência de cada interação. Os peixes hospedeiros estão amostrados na filogenia vertical e os parasitos amostrados na filogenia horizontal. Os valores de prevalência representam a presença de relacionamento entre as espécies de Gyrodactylidae e de seus hospedeiros. Os ramos e nomes de espécies em tonalidade escura em cada filogenia representa a presença de cada espécie de hospedeiro e parasito na microbacia, enquanto os mais claros representam a ausência de cada espécie.

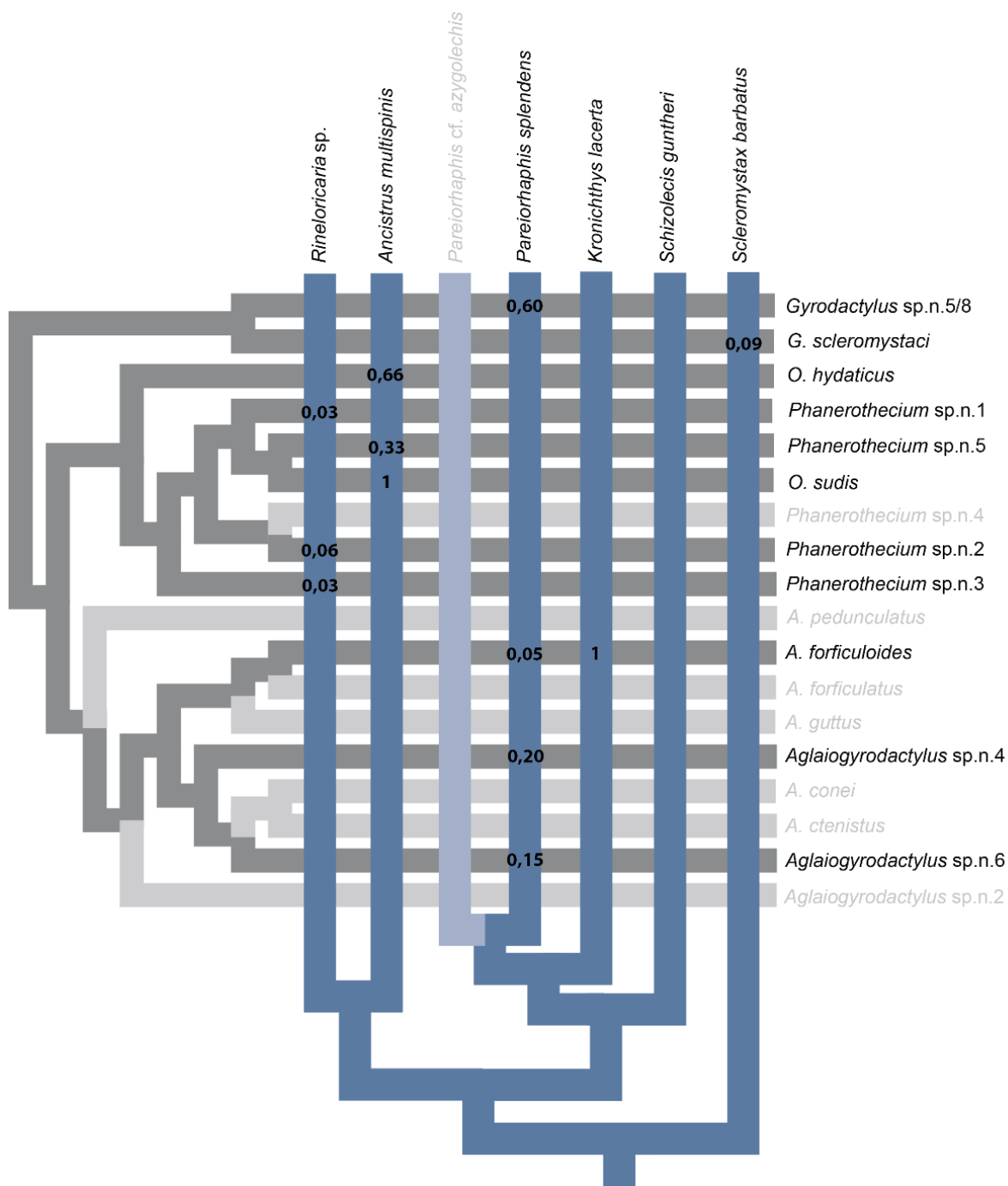


Figura 14. Representação gráfica das interações ecológicas entre as espécies de Gyrodactylidae e seus hospedeiros da microbacia do rio Cacatu, com informações de prevalência de cada interação. Os peixes hospedeiros estão amostrados na filogenia vertical e os parasitos amostrados na filogenia horizontal. Os valores de prevalência representam a presença de relacionamento entre as espécies de Gyrodactylidae e de seus hospedeiros. Os ramos e nomes de espécies em tonalidade escura em cada filogenia representa a presença de cada espécie de hospedeiro e parasito na microbacia, enquanto os mais claros representam a ausência de cada espécie.

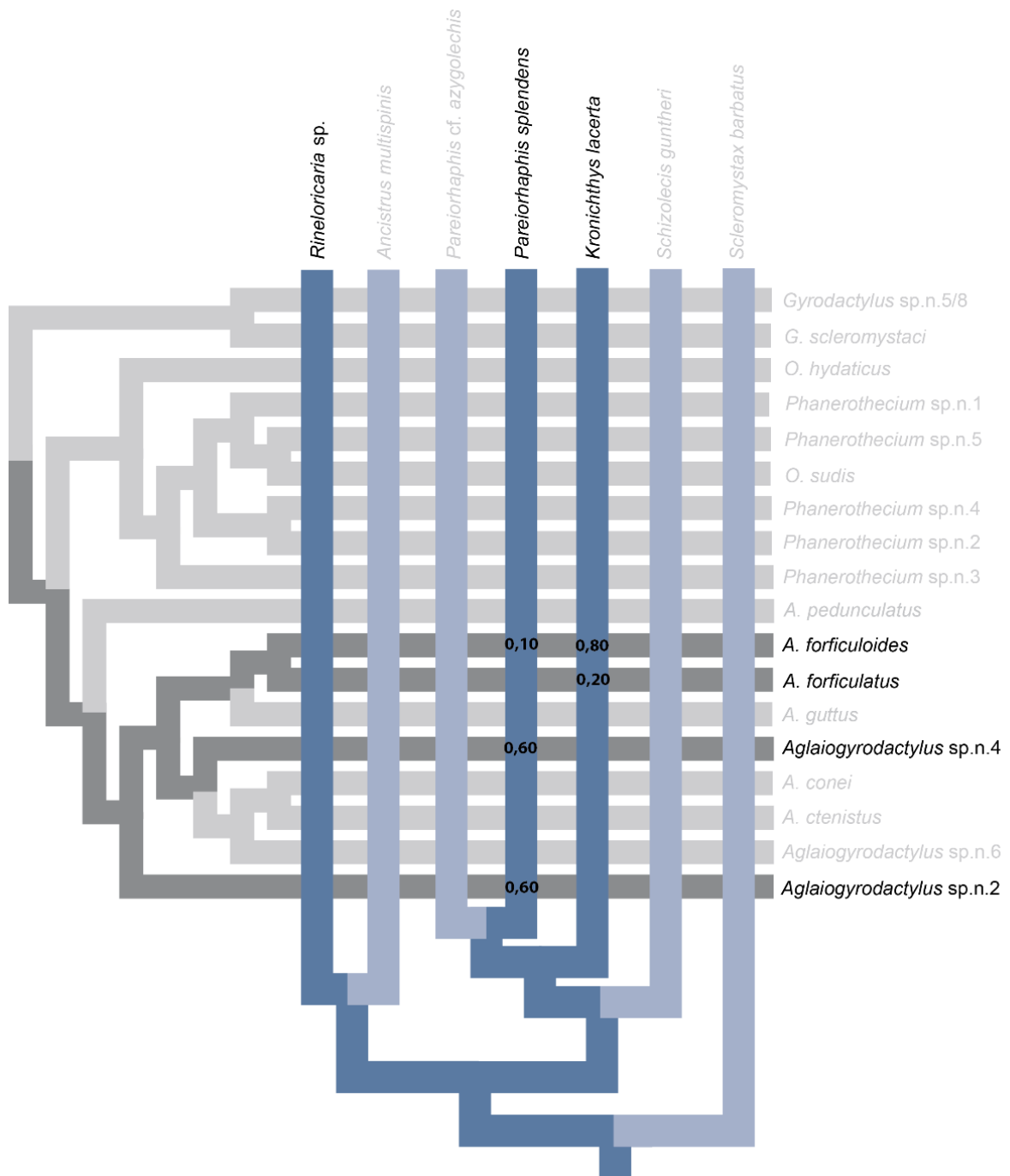


Figura 15. Representação gráfica das interações ecológicas entre as espécies de Gyrodactylidae e seus hospedeiros da microbacia do rio Cachoeira, com informações de prevalência de cada interação. Os peixes hospedeiros estão amostrados na filogenia vertical e os parasitos amostrados na filogenia horizontal. Os valores de prevalência representam a presença de relacionamento entre as espécies de Gyrodactylidae e de seus hospedeiros. Os ramos e nomes de espécies em tonalidade escura em cada filogenia representa a presença de cada espécie de hospedeiro e parasito na microbacia, enquanto os mais claros representam a ausência de cada espécie.

A análise de interação da microbacia do Tagaçaba (rio Capivari e Tagaçaba) (Figura 16), mostrou *Rineloricaria* sp. Como o hospedeiro com a maior riqueza de parasito, três espécies no total. O maior valor de prevalência para essa microbacia foi para *A. forficuloides* (1,00 em *K. lacerta*) e o menor para *Phanerothecium* sp. n. 3 (0,10

em *Rineloricaria* sp.). Os dados morfológicos identificaram ainda, *M. microlepis*, parasitada por *Gyrodactylus* sp. n. 9, com prevalência de 0,50. *Aglaogyrodactylus forficulatus* também foi encontrada parasitando um loricarídeo não identificado com prevalência igual a 0,50. Foi encontrado apenas um espécime de Gyrodactylidae parasitando *S. barbatus*, entretanto, não foi possível sua identificação.

A rede da microbacia do Serra Negra (rio Bananal e Pederneiras) (Figura 17), mostra *K. lacerta* sendo compartilhada por quatro espécies de girodactilídeo. Três espécies apresentaram maior valor de prevalência. O menor valor 0,03 apresentado pelas espécies *G. scleromystaci* em *S. barbatus*. Os dados morfológicos indicaram um espécime de *A. salebrosus* em *P. splendens* com prevalência igual a 0,50. Além de *A. forficulatus* (1) e *A. forficuloides* (0,50) em loricarídeos não identificados. Não foi encontrado nenhuma espécie parasita em *M. microlepis*.

Na microbacia do rio Guaraqueçaba (rio Morato) (Figura 18), a espécie hospedeira com maior riqueza de girodactilídeos foi *Rineloricaria* sp. A maior prevalência (0,08) foi observada em *O. sudis* parasitando *A. multispinis* e *A. forficulatus* em *K. lacerta* e a menor (0,02) apresentada pelas espécies *A. forficulatus* e *A. forficuloides* em *Rineloricaria* sp.. Os dados morfológicos identificaram espécimes de *A. forficulatus* e *A. guttus* parasitando um loricarídeo não identificado com prevalência igual a 0,50. *Mimagoniates microlepis* não foi encontrado nenhuma espécie de parasito.

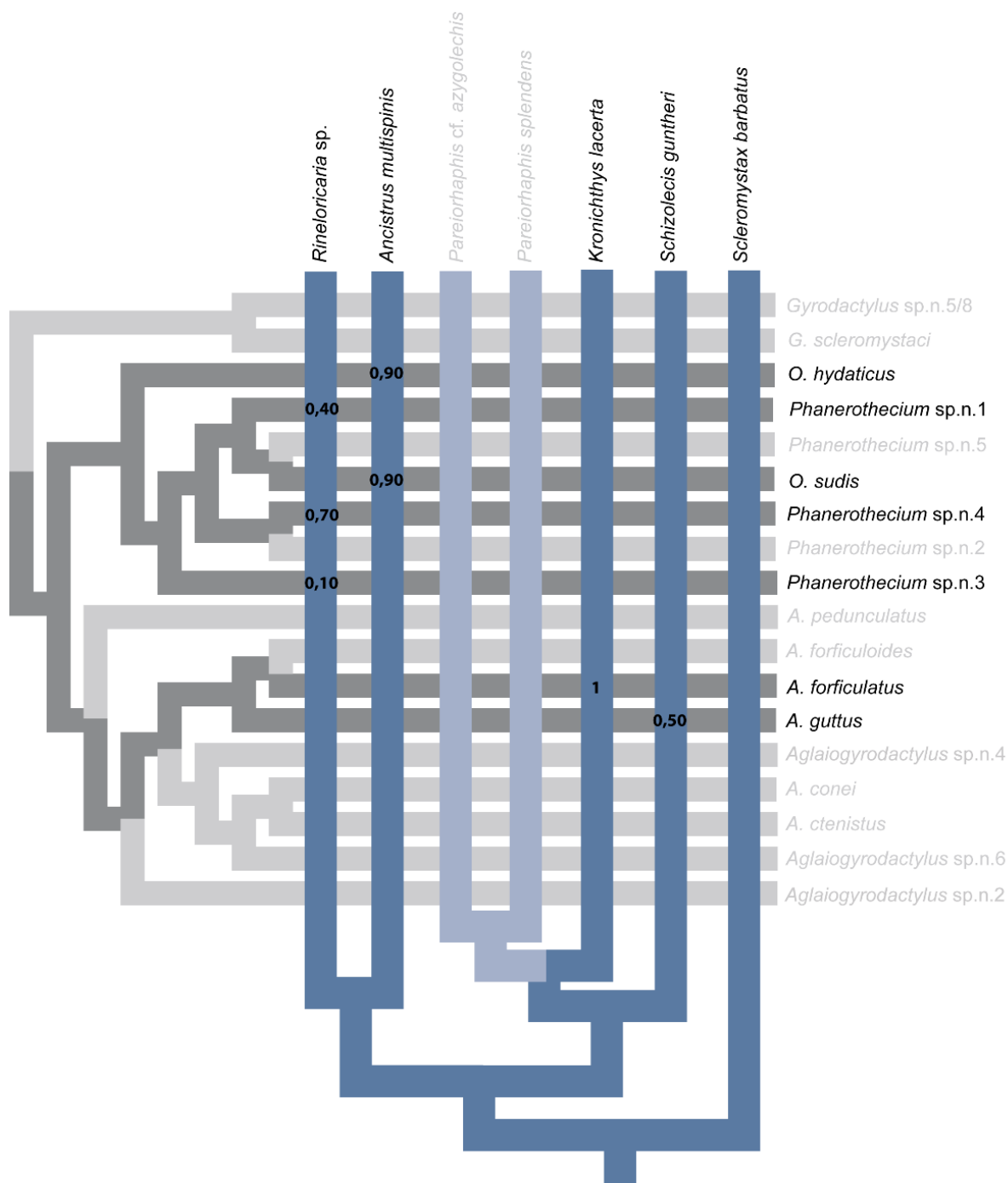


Figura 16. Representação gráfica das interações ecológicas entre as espécies de Gyrodactylidae e seus hospedeiros da microbacia do rio Tagaçaba, com informações de prevalência de cada interação. Os peixes hospedeiros estão amostrados na filogenia vertical e os parasitos amostrados na filogenia horizontal. Os valores de prevalência representam a presença de relacionamento entre as espécies de Gyrodactylidae e de seus hospedeiros. Os ramos e nomes de espécies em tonalidade escura em cada filogenia representa a presença de cada espécie de hospedeiro e parasito na microbacia, enquanto os mais claros representam a ausência de cada espécie.

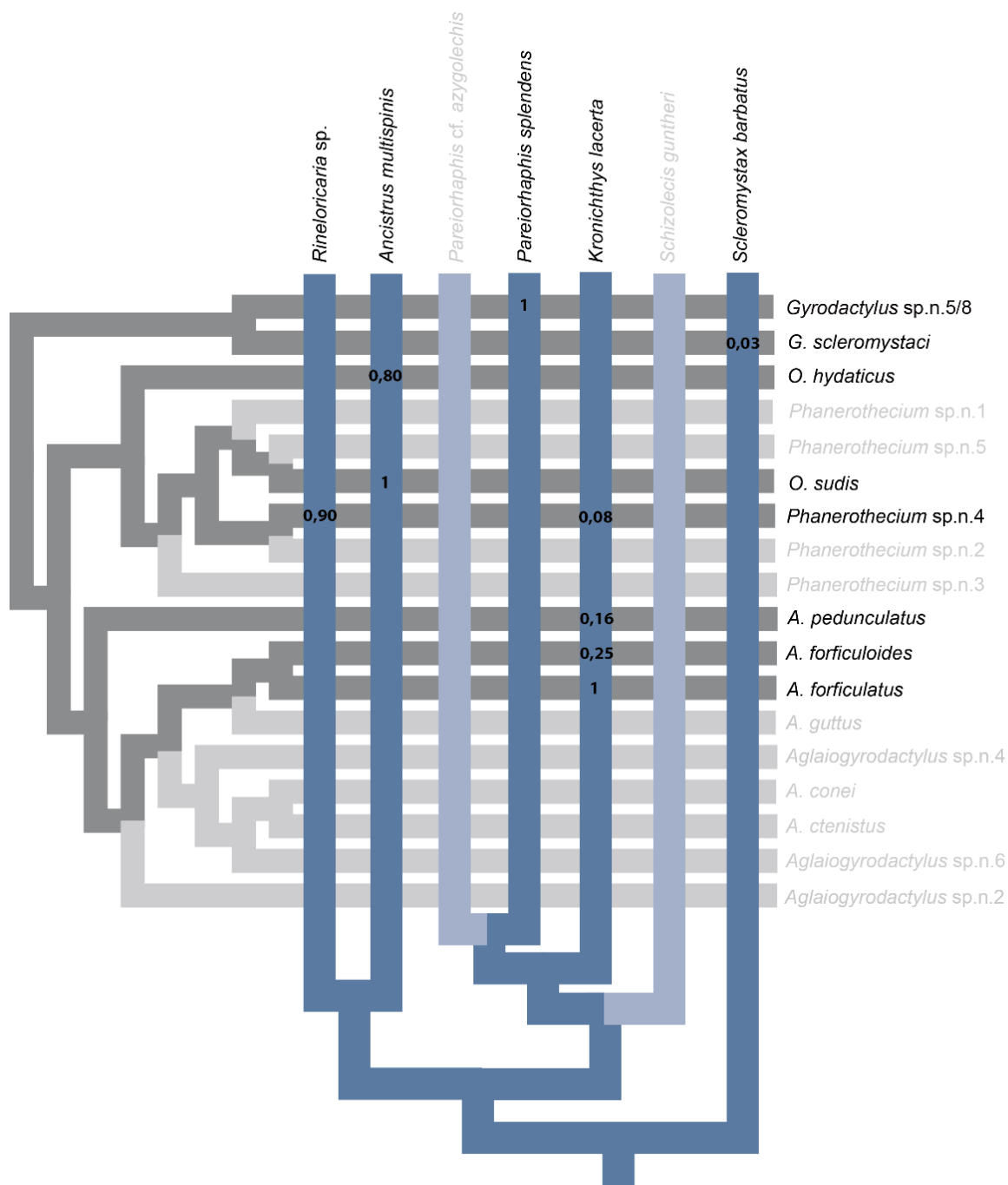


Figura 17. Representação gráfica das interações ecológicas entre as espécies de Gyrodactylidae e seus hospedeiros da microbacia do rio Serra Negra, com informações de prevalência de cada interação. Os peixes hospedeiros estão amostrados na filogenia vertical e os parasitos amostrados na filogenia horizontal. Os valores de prevalência representam a presença de relacionamento entre as espécies de Gyrodactylidae e de seus hospedeiros. Os ramos e nomes de espécies em tonalidade escura em cada filogenia representa a presença de cada espécie de hospedeiro e parasito na microbacia, enquanto os mais claros representam a ausência de cada espécie.

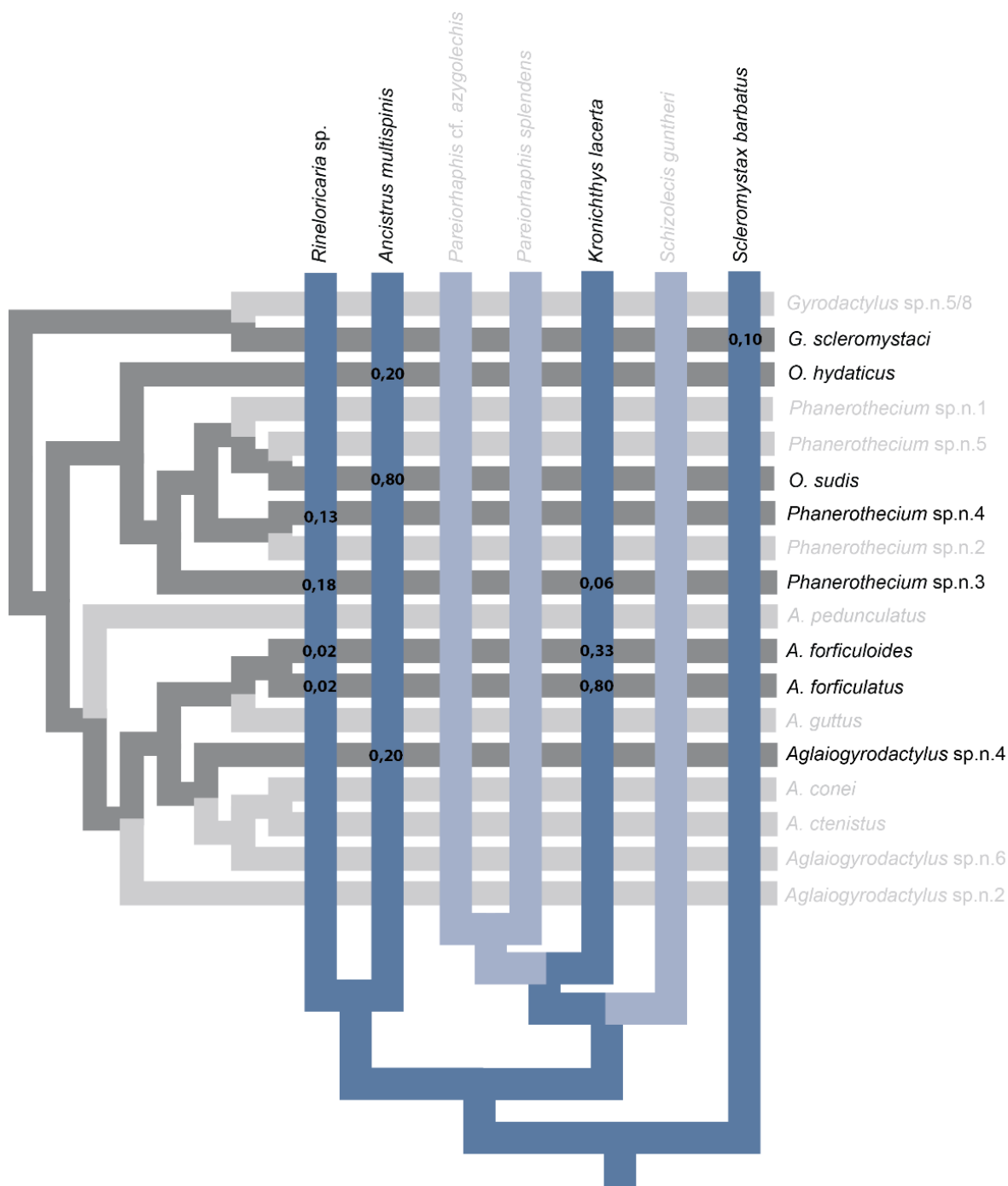


Figura 18. Representação gráfica das interações ecológicas entre as espécies de Gyrodactylidae e seus hospedeiros da microbacia do rio Guaraqueçaba, com informações de prevalência de cada interação. Os peixes hospedeiros estão amostrados na filogenia vertical e os parasitos amostrados na filogenia horizontal. Os valores de prevalência representam a presença de relacionamento entre as espécies de Gyrodactylidae e de seus hospedeiros. Os ramos e nomes de espécies em tonalidade escura em cada filogenia representa a presença de cada espécie de hospedeiro e parasito na microbacia, enquanto os mais claros representam a ausência de cada espécie.

Foram encontrados seis módulos de agrupamento para o sistema hospedeiro-parasito da planície costeira do Paraná (Figura 19). Os quatro primeiros módulos estão formados por hospedeiros Loricariidae e os dois últimos formados um pela espécie hospedeira de Characidae e o último por um Callichthyidae e seus parasitos. O primeiro módulo foi o único a apresentar apenas uma interação (*S. guntheri* + *A. guttus*). O módulo formado pelos hospedeiros *Rineloricaria* sp., *K. lacerta* e por espécimes de loricarídeos não identificados apresentou maior riqueza de espécies.

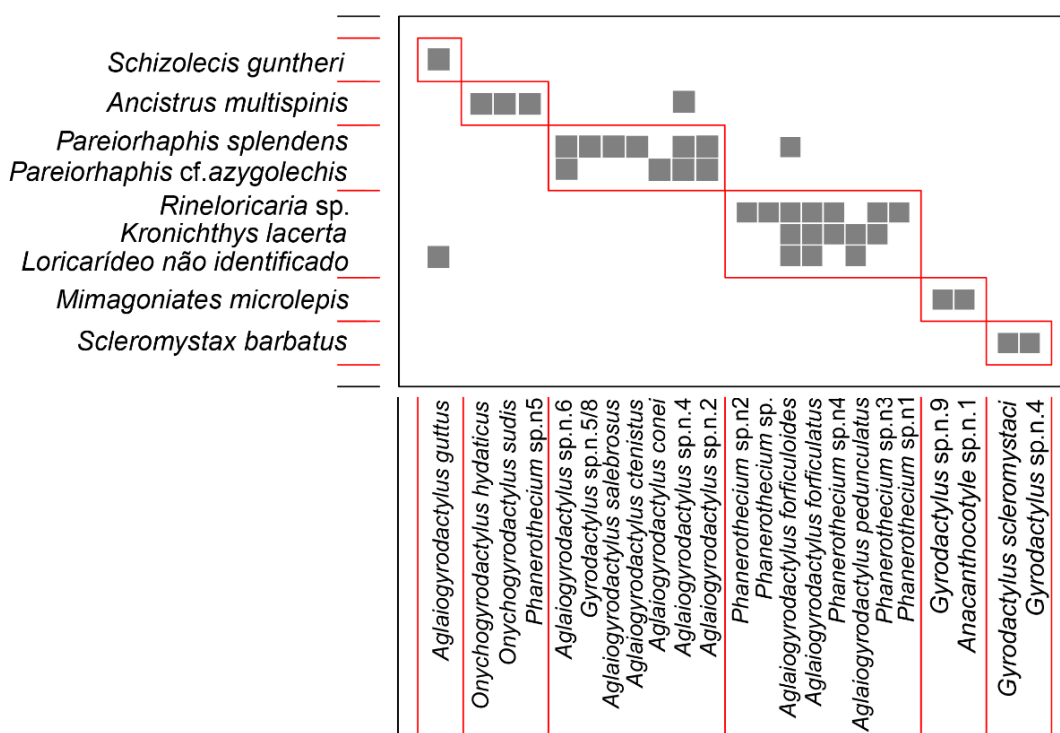


Figura 19. Representação gráfica dos módulos gerados pelas associações hospedeiro-parasitos do sistema da Baía de Paranaguá, com informações de ausência e presença de interações. Os quadrados centrais representam as interações entre parasitos e seus hospedeiros dentro e fora de cada módulo. Os módulos estão representados pelos retângulos vermelhos. Os peixes hospedeiros estão amostrados à esquerda e os parasitos a baixo.

Os valores do índice de especialização da rede (H_2') para cada microbacia da planície costeira e do agrupamento destas foram obtidos e amostrados na Tabela 8. Não foi possível calcular o valor de especialização para as espécies da microbacia do Guaraguaçu. Essa microbacia está representada por apenas uma espécie hospedeira, tornado inviável o cálculo de especialização. Três microbacias apresentaram o valor máximo de especialização 1. Os índices de especialização para cada microbacia está apresentado na Tabela 8.

Tabela 8. Índice de especialização da rede (H_2'). Os valores de H_2' são os resultados normalizados de especialização do sistema hospedeiro-parasito de cada microbacia e de todas agrupadas.

<i>Microbacias</i>	<i>H₂'</i>
Guaraguaçu	-
Sagrado	1
Nhundiaquara	1
Cacatu	0,964
Cachoeira	0,957
Tagaçaba	1
Serra Negra	0,937
Guaraqueçaba	0,819
Sistema completo	0,880

A análise de correlação linear utilizada para testar a correspondência entre o índice de especialização e riqueza de espécies hospedeiras de cada microbacia não foi significativa ($r^2 = 0,00$ e $p = 0,99$).

Espectro de hospedeiros e distância filogenética

Contrário do que se esperava, como um corolário do conservatismo filogenético, um componente de *ecological fitting* (vide Agosta & Klemens, 2008), hospedeiros compartilhados por uma espécie de parasito não são necessariamente linhagens filogeneticamente mais próximas entre si. Na realidade, na maioria dos casos, hospedeiros filogeneticamente distantes são mais frequentemente parte do espectro de hospedeiros de uma espécie de Gyrodactylidae ovípara do que espécies filogeneticamente próximas (veja Figuras 11-17 e Figura. 22). Considerando-se as redes das respectivas microbacias, separadamente, apenas nas microbacias do rio Cachoeira e em algumas microbacias vizinhas da Baía de Laranjeiras (microbacias do Norte), algumas espécies apresentam um espectro de hospedeiro maior do que um. *Aglaiogyrodactylus forficulatus* e *A. forficuloides* são parasitos que apresentam uma maior capacidade de explorar recursos (hospedeiros) distintos. Na microbacia do Cachoeira, *A. forficuloides* parasita de *K. lacerta* e *P. splendens*, espécies que são filogeneticamente próximas (Figura 15). *Phanerothecium* sp. n. 4 parasita tanto *Rineloricaria* sp., com alta prevalência, e *K. lacerta*, com baixa prevalência, na microbacia do rio Serra Negra; as duas espécies hospedeiras são localizadas em posições relativamente distantes na filogenia do Loricariidae (Figura 9). Todavia, é na microbacia do rio Guaraqueçaba que parasitos exploram um maior número de

espécies hospedeiras (Figura 18). Três espécies de parasitos (*A. forficuloides*, *A. forficulatus* e *Phanerothecium* sp. n. 3) utilizam duas espécies distantes de hospedeiros, *K. lacerta* e *Rineloricaria* sp..

Na rede que inclui todas as associações combinadas (Figura 19), fica evidente a habilidade de algumas espécies em parasitar espécies distintas em microbacias diferentes e isoladas. *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 2, *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 4 e *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 6, parasitam espécies distintas, mas irmãs (na presente análise) de *Pareiorhaphis*, as quais não são encontradas em simpatria.

Reconstrução Histórica

A árvore final do PACT (Figura 20) reproduzida no Mesquite apresenta dois cladogramas, o primeiro com a reconstrução de hospedeiros ancestrais e o segundo com a distribuição geográfica de cada associação (Norte e Oeste) (conforme protocolo de Liebermann, 2000, 2003 a,b).

No cladograma a esquerda, nove nós apresentam sinais de isolamento, indicando isolamento (especiação?) das linhagens parasitas em determinadas espécies hospedeiras. Um nó apresenta sinal de expansão, i.e. de ampliação do espectro de hospedeiros. Portanto, a história das associações hospedeiros-parasitos para a área estudada é claramente complexa, um mosaico de eventos antigos e recentes de expansão de hospedeiros e isolamentos. Aparentemente, os hospedeiros ancestrais das linhagens de parasitos, *Phanerothecium* + *Onychogyrodactylus* e *Aglaiogyrodactylus*, era composto por cinco de um total de 6 hospedeiros utilizados nesse estudo. Até o nó, onde ocorreu a expansão de uma nova espécie hospedeira, *S. guntheri*, os nós mais antigos refletiram eventos de isolamento, provavelmente representando processos de especiação e/ou dispersão da linhagem de parasito. Associações mais recentes parecem representar processos de incorporação recentes de hospedeiros e diversos grupos de parasitos (e.g. *A. forficulatus* em *K. lacerta*; *A. forficuloides* em *P. splendens*, *K. lacerta*; *Phanerothecium* sp. n. 4 em *K. lacerta*). Alguns eventos de divergência recente através de isolamento ocorrem, em especial entre *A. coneii* e *A. ctenistus*. Apenas alguns poucos nós desse cladograma poderiam estar associados a processos de co-especiação, mas a reconstrução das áreas geográficas no cladograma a direita da Figura 20, sugere que grande parte das associações estudadas remontam aos últimos 10.000 anos. No cladograma a direita,

existe um conspícuo isolamento recente que resultou nas associações das bacias do Norte e das bacias do Oeste. Esse nó provavelmente reflete o isolamento decorrente da elevação do nível do mar, isolando as paleobacias do Norte e do Oeste, algo que ocorreu por volta dos 10.000 anos atrás, como sugerido por Tschá (2016). Alguns eventos de incorporação de novos hospedeiros no espectro de hospedeiros de uma espécie parasita ocorreram em decorrência de dispersão entre os dois conjuntos de bacias (Norte e Oeste).

Valores de prevalência de cada associação de parasitos e seus hospedeiros por microbacia estão representados em forma de histogramas na Figura 21.

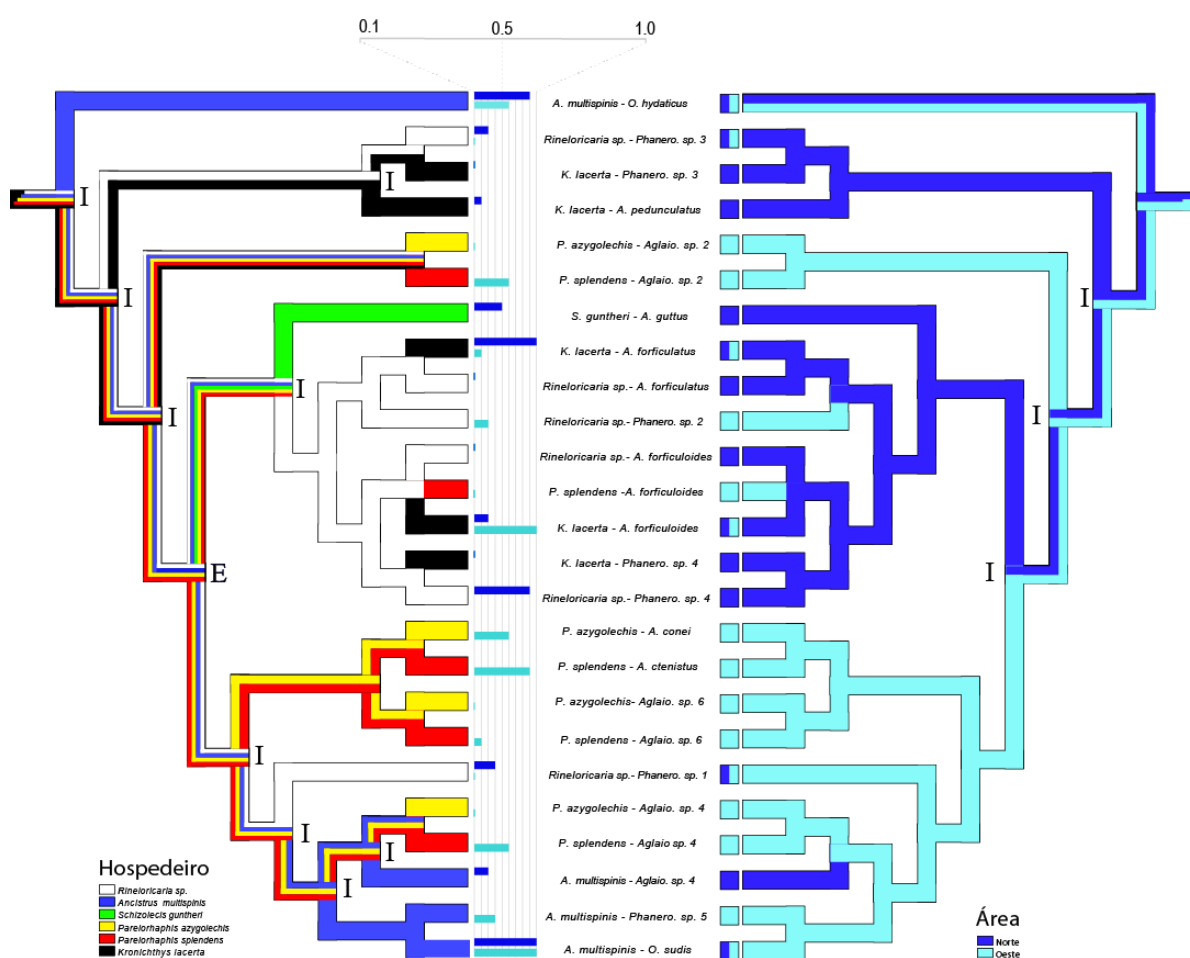


Figura 20. Cladograma final obtido pelo PACT compilando as filogenias de *Aglaiogyrodactylus* e *Phanerothecium* + *Onychogyrodactylus* e seus hospedeiros. O cladograma a esquerda, representa as associações históricas entre espécies de parasitos e seus hospedeiros. Os maiores valores de prevalência de associação para as microbacias da região Oeste e Norte da Baía de Paranaguá estão apresentados na extremidade dos ramos do cladograma a esquerda. O cladograma a direita apresenta as associações históricas registradas em cada área/microbacias (Oeste e Norte). Na extremidade dos ramos está indicado se a associação observada ocorre em uma ou nas duas áreas. Os nós resultantes de eventos de isolamentos (I) e expansão (E) estão apresentados de acordo com o protocolo de Lieberman's.

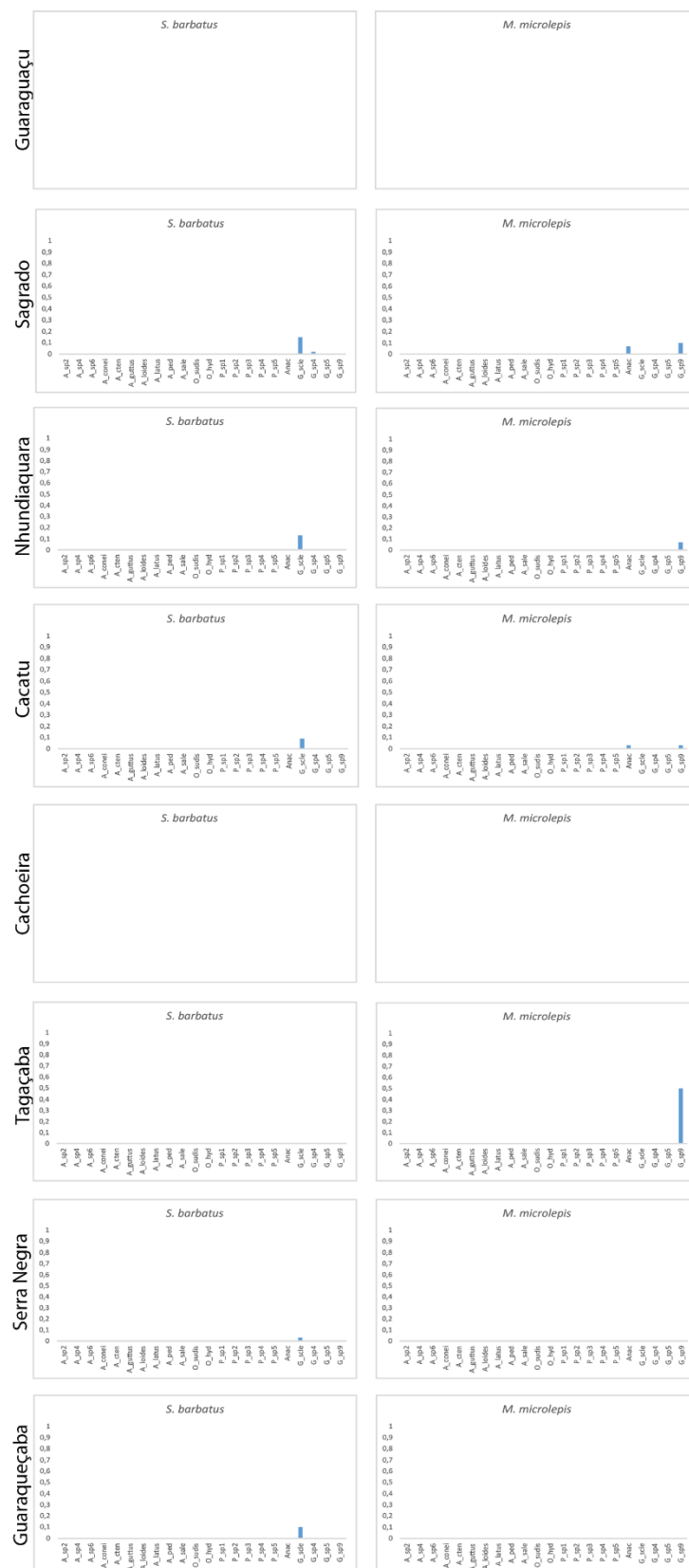


Figura 21. Histograma indicando valores de prevalência de associação entre hospedeiros e espécies de Gyrodactylidae encontrados em cada microbacia estudada. Histogramas sem indicação de prevalência indicam a presença do hospedeiro e ausência do parasito. O eixo “y” indica os valores de prevalência e “x” todas as espécies de girodactilídeos encontradas no sistema da Baía de Paranaguá. Os retângulos vazios representam a ausência do hospedeiro na microbacia.

A reconstrução das redes ancestrais hipotéticas do sistema hospedeiro–parasito para as bacias do Norte (Baía de Laranjeiras), Oeste (Baía de Antonina) e geral (Baía de Paranaguá) são apresentadas na Figura 22. Uma rede única, postula-se, existir no período de expansão máxima das microbacias da Baía de Paranaguá (vide Tschá, 2016) até cerca de 10.000 anos atrás, quando o nível do mar na região atingiu cerca de 10 m abaixo do nível presente. Conforme reconstrução de paleodranagens (Tschá, 2016), o sistema dulcícola da Baía de Paranaguá fragmentou-se em dois subsistemas: o sistema hídrico da Baía de Antonina (Oeste) e o sistema da Baía de Laranjeiras (Norte). Em cada novo sistema é possível observar a extinção local de pelo menos uma espécie hospedeira. Com o nível do mar atingido a cota de 4.5 m acima do atual nível do mar a cerca de 5.100, cada uma dessas microbacias fragmentou-se em diversas sub-bacias, que tiveram sua área de cobertura reduzida pela proximidade dos contrafortes da Serra do Mar. Com a redução do nível do mar para o estado atual, uma pequena expansão e conexão de bacias vizinhas deve ter ocorrido. As redes ecológicas atuais para cada microbacia individual são resultantes das redes ancestrais.

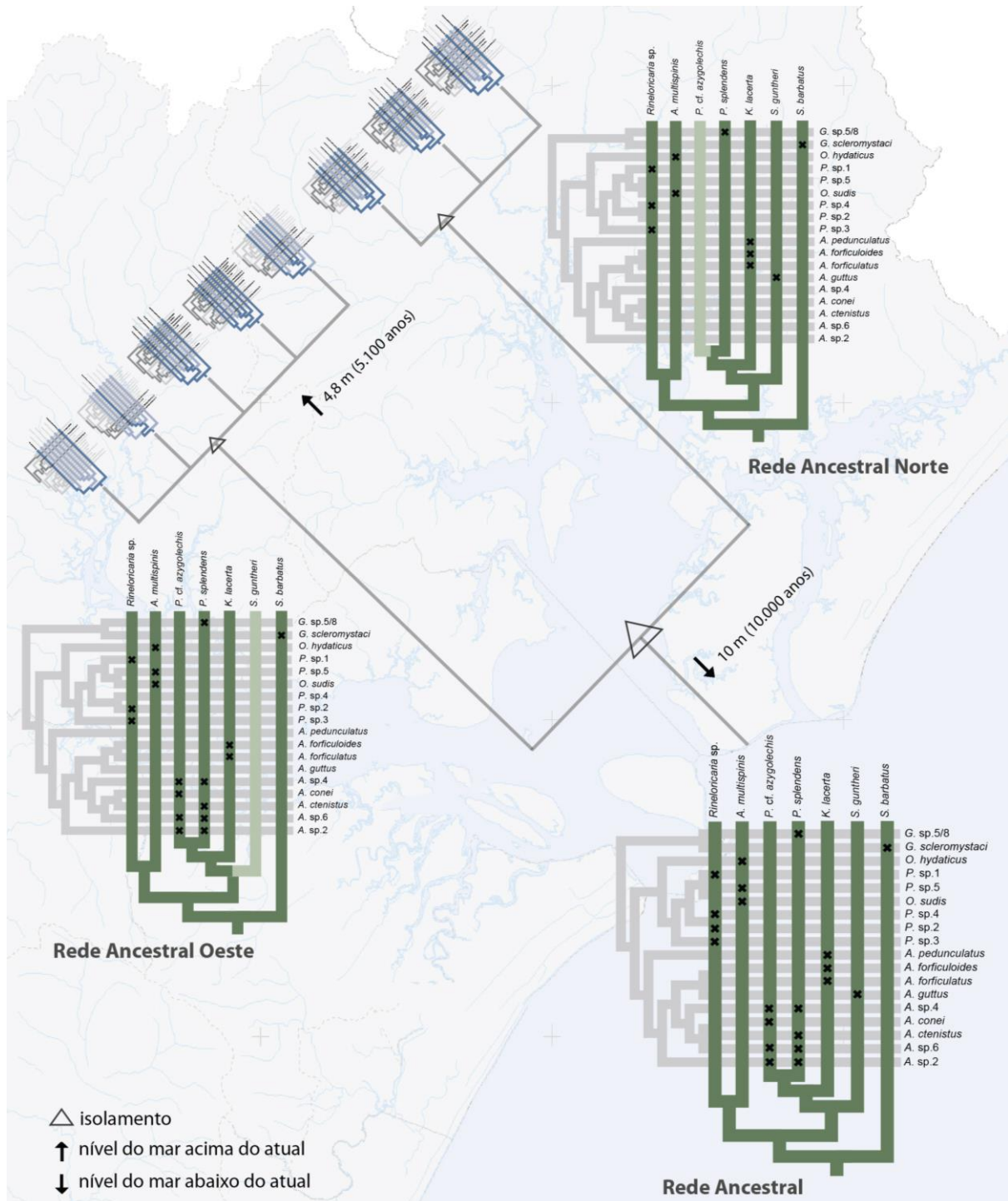


Figura 22. Ilustração da história ancestral do sistema hospedeiro-parasito da Baía de Paranaguá visualizada na forma de redes de interação ecológica. Os “x” em cada rede representa a interação entre as espécies de Gyrodactylidae e seus hospedeiros. Os triângulos indicam período em que ocorreram eventos de isolamento nas comunidades como datado por Tschá (2016). As setas voltadas para acima indicam os dois momentos em que ocorram transgressões marinhas e a seta voltada para baixo indica o momento em que ocorreu uma regressão do nível do mar.

IV. Discussão

A composição da comunidade de hospedeiros e parasitos das microbacias estudadas mostram evidências da influência de eventos geológicos históricos e climatológicos recentes. Esse estudo utilizou como cenário oito microbacias que compõem a Baía de Paranaguá. Os resultados mostram diferenças na composição das comunidades de algumas espécies de hospedeiros e parasitos encontrados em sub-bacias do Oeste e Norte, suportando a proposta de Tschá (2016) para as comunidades de peixes da região.

As alterações do nível do mar causadas por transgressões e regressões marinhas durante o Pleistoceno na costa da América do Sul (Weitzman et al., 1988, Suguio et al., 1985; Martin et al., 1996; Angulo & Lessa, 1997; Martin, 2003) provavelmente influenciaram a história evolutiva de comunidades aquáticas. Os eventos de conexão e isolamento de rios/microbacias, ocasionaram misturas e extinção local de espécies de hospedeiros e seus parasitos. O cenário encontrado na Baía de Paranaguá corrobora com pressupostos do Paradigma de Estocolmo, dando suporte para as quatro previsões propostas nesse estudo.

A primeira previsão sugere que, mesmo na ausência de seu hospedeiro original, uma espécie de parasito poderá sobreviver em outra espécie hospedeira por meio de *Ecological fitting* (Janzen, 1985). A capacidade de uma espécie de utilizar vários hospedeiros aumenta a chance de sobrevivência durante episódios de perturbações ambientais, tais como alterações climáticas (Hoberg & Brooks, 2008).

Nesse estudo, observamos três espécies de parasitos ocorrendo em novos hospedeiros em microbacias nas quais a espécie hospedeira original (maior prevalência) não estava presente. Os girodactilídeos ovíparos, *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 2, *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 4 e *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 6, compartilharam na microbacia do Guaraguaçu a única espécie hospedeira coletada no local (*P. cf. azygolechis*). Essas espécies utilizaram seu novo hospedeiro em baixa prevalência (0,04, 0,04 e 0,08, respectivamente) quando comparado com seu outro hospedeiro ancestral (conforme as redes ancestrais putativas), *P. splendens* (prevalência variando de 0,15-0,60). Esse resultado reforça que mesmo na ausência do hospedeiro original/ancestral uma linhagem de parasito pode sobreviver, mesmo ocorrendo em menor prevalência, o que provavelmente reflete condições de sobrevivência subótimas ao recurso disponibilizado pelas demais espécies hospedeiras.

Aglaigyrodactylus sp. n. 4 foi detectado em uma espécie hospedeira (*A. multispinis*) distinta daquela original (conforme a rede ancestral para as redes da Baía de Laranjeiras), na microbacia do rio Guaraqueçaba na qual espécies de *Pareiorhaphis* são ausentes. Essa nova associação foi representada por uma prevalência igual a 0,20, um pouco mais representativa do que os valores encontrados em *P. cf. azygolechis*, mais ainda mais baixos do que aqueles observados quando em associação com *P. splendens* (ver tabela 7). Em ambos os casos esse parasito utilizou novas espécies de hospedeiros em baixa prevalência em locais onde pelo menos um de seus hospedeiros ancestrais (conforme a rede ancestral proposta) não estava presente.

Esse estudo também observou espécies de parasitos que ampliam seu espectro de hospedeiros, mesmo na presença de hospedeiros ancestrais como sugerido pelas redes ancestrais hipotéticas. *Aglaigyrodactylus forficuloides* ocorreu em duas novas espécies hospedeiras, em menor prevalência, mesmo na presença de seu hospedeiro ancestral (*K. lacerta*). *Pareiorhaphis splendens* (Neoplecostominae), uma das duas espécies hospedeiras que compõe esse espectro de hospedeiros, foi utilizada nas microbacias do rio Cacatu e Cachoeira, nas quais ocorreu em simpatria com *K. lacerta*. Entretanto, o compartilhamento desse novo hospedeiro na microbacia do rio Cacatu, só ocorreu no rio Cacatu, onde os dois hospedeiros ocorreram em simpatria. Enquanto no rio do Nunes, rio que também compõem a microbacia do rio Cacatu, não foi encontrado essa espécie de parasito e nem seu hospedeiro ancestral. Nesse caso, parece que essa espécie de parasito não conseguiu colonizar o novo hospedeiro (*P. splendens*) em um ambiente onde seu hospedeiro original não estava presente. *Aglaigyrodactylus forficuloides* ocorreu ainda em *Rineloricaria* sp. (subfamília Loricariinae), hospedeiro filogeneticamente distante do ancestral, juntamente com *A. forficulatus*. Na microbacia do Guaraqueçaba ambas as espécies de parasitos apresentaram o mesmo valor de baixo de prevalência (0,02).

Os hospedeiros *Rineloricaria* sp. e *K. lacerta* compartilharam outras duas espécies de parasitos, *Phanerothecium* sp. n. 3 e *Phanerothecium* sp. n. 4. As duas espécies de parasitos ocorrem em maior prevalência em *Rineloricaria* sp., *Phanerothecium* sp. n. 3 ocorreu em *K. lacerta* em menor prevalência (0,06) na microbacia do Guaraqueçaba e *Phanerothecium* sp. n. 4, ocorreu nesse mesmo hospedeiro com prevalência (0,08) na microbacia do Serra Negra. Mais uma vez, a

incorporação de uma nova espécie no espectro de hospedeiros de *Phanerothecium* sp. n. 4 (i.e. *K. lacerta*) ocorreu apenas em um dos rios dessa microbacia, o rio Bananal, em simpatia com o hospedeiro ancestral, *Rineloricaria* sp.

Aparentemente, a oportunidade de encontrar novos hospedeiros em cada microbacia, somada a compatibilidade em utilizar os novos recursos disponíveis (ver Araujo et al., 2015), juntamente com o *ecological fitting* e *sloppy fitness space*, possibilitou que algumas espécies de parasito desse sistema, colonizassem novas espécies de hospedeiro na ausência e na presença de seu hospedeiro original. Para que ocorra a colonização de um novo hospedeiro (por *ecological fitting*), não há necessidade de mudanças genéticas ou evolutivas na espécie de parasito (Agosta et al., 2010).

A extinção local de espécies parasitos parece ter ocorrido de forma extensa, provavelmente como consequência da redução de habitat associada com os maiores níveis do mar recentes. Sete espécies ovíparas de Gyrodactylidae (*Phanerothecium* sp. n. 5, *Phanerothecium* sp. n. 2, *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 2, *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 4, *Aglaiogyrodactylus* sp. n. 6, *A. coneí* e *A. ctenistus*) e duas espécies vivíparas (*Anacanthocotyle* sp. n. 1 e *Gyrodactylus* sp. n. 4), não foram encontradas nas microbacias do Norte, mesmo quando observada a presença de seus respectivos hospedeiros ancestrais nessas bacias. Nas bacias do Oeste (associadas à Baía de Antonina), *Phanerothecium* sp. n. 4, *A. guttus*, *A. pedunculatus* e *A. salebrosus*, não foram encontradas nas microbacias do Oeste, mesmo com a presença de seus respectivos hospedeiros ancestrais. Já as espécies ovíparas *O. hydaticus*, *O. sudis*, *Phanerothecium* sp. n. 1, *Phanerothecium* sp. n. 3, *A. forficulatus*, *A. forficuloides* e as espécies vivíparas, *Gyrodactylus* sp. n. 9 e *Gyrodactylus scleromystaci*, ocorreram em praticamente todas as microbacias do sistema, interagindo principalmente com seus hospedeiros ancestrais. As duas espécies de *Onychogyrodactylus*, *Phanerothecium* sp. n. 1 e as duas espécies vivíparas de *Gyrodactylus* mostraram-se altamente associadas a seus hospedeiros ancestrais hipotéticos. Esses parasitos não utilizaram outros recursos, mesmo quando a oportunidade se fez presente (i.e. outras espécies de hospedeiros potencialmente compatíveis encontravam-se em simpatia).

Esses resultados corroboram com a descrição do papel do *ecological fitting* prevista de Hoberg e Brooks (2015), na expansão de espécies, (i) uma espécie hospedeira poderá expandir e o parasito se extinguir; (ii) hospedeiros e parasitos

expandem e persistem (expondo espécies de hospedeiros e populações de parasitos a trocas), (iii) o hospedeiro poderá expandir, introduzindo o parasito em uma nova comunidade e seu hospedeiro original não persistirá; (iv) hospedeiro se expande (sem o parasito), e adquire novos conjuntos de parasitos dessa comunidade endêmica.

Araujo et al. (2015) sugerem que para estabelecer associações a longo prazo, as espécies devem ser minimamente compatíveis com seus novos hospedeiros, sendo capazes de superar os obstáculos impostos pela nova associação (e.g. respostas imunológica e barreiras físicas). De acordo com Agosta (2006), as alterações climáticas podem ocasionar a extinção dos hospedeiros originais e/ou isolar geograficamente as populações.

A segunda previsão sugere que em microbacias com maior disponibilidade de espécies de hospedeiros (i.e. oportunidade) maior será o espectro de espécies que o parasito utilizará. Dez espécies de Gyrodactylidae ovíparos ocorreram em apenas uma espécie de loricarídeo, cinco espécies ocorreram em dois loricarídeos e duas espécies em três loricarídeos. Já as espécies vivíparas, uma espécie ocorre em um loricarídeo, duas ocorrem em uma espécie hospedeira de calictídeo, duas ocorrem em uma espécie hospedeira de caracídeo. O número de hospedeiros em cada microbacia, índice de especialização e prevalência, foram considerados informações complementares para avaliar a oportunidade e compatibilidade das associações entre espécies de hospedeiro e seus parasitos.

A relação de abundância/prevalência pode ser explicada pela especificidade do parasito com o hospedeiro (Poulin, 1999). Parasitos possuem diferentes adaptações para explorar novas espécies hospedeiras e despistar a resposta imune do hospedeiro. As adaptações podem ser um *trade-off* entre o número de espécies de hospedeiros e a abundância/prevalência parasitária entre as espécies (Poulin, 1998). A análise de especialização de interações entre hospedeiro-parasita tem sido geralmente vista a partir da perspectiva dos parasitos. Uma aparente generalização destes resultados pode estar vinculada ao fato de que a maioria das espécies de parasitos exploram mais de uma espécie hospedeira (Gregory et al., 1991; Poulin, 1992). Entretanto, se observado pela perspectiva do hospedeiro, a maioria das espécies hospedeiras compartilham poucas espécies parasitas e apenas algumas espécies hospedeiras são compartilhadas por muitos parasitos (Poulin, 1995). Portanto, quanto maior for o número de espécies de hospedeiros disponíveis em uma

microbacia (i.e. maior oportunidade), maior será o número de espécies compartilhadas por um parasito, e consequentemente menor será o índice de especialização do sistema.

A análise de regressão rejeitou a relação proposta entre o número de espécie de peixes de uma microbacia vs o índice de especialização calculado (H_2'). Assim, mesmo quando uma microbacia apresenta maior número de espécie hospedeiras, o que consequentemente refletiria em maiores oportunidades para novas associações, não foi possível observar maior número de compartilhamentos com espécies hospedeiras, o que resultou em redes altamente especializadas.

Considerando que o índice de especialização é influenciado tanto pelas associações ocorrendo pela perspectiva de parasitos quanto de seus hospedeiros, quanto mais compartilhamentos encontramos para uma espécie de parasito e uma espécie de hospedeiro, menor será a especialização do sistema. O índice de especialização encontrado para todo o sistema da Baía de Paranaguá, considerando todas as associações encontradas, foi igual a 0,88, indicando um sistema especializado e com poucos compartilhamentos entre espécies.

Consequentemente, o sistema da Baía de Paranaguá apresenta poucas interações entre os módulos formados (vide Figura 19). Segundo Bellay et al. (2015), o relacionamento filogenético de espécies hospedeiras influencia a modularidade da rede de um sistema. Estudos com Monogenoidea (ectoparasitos) de fato sugerem que hospedeiros filogeneticamente próximos tendem a apresentar maior chance de pertencer ao mesmo módulo (Braga et al, 2014). Segundo Fontaine et al. (2011), redes com elevado nível de intimidade (e.g. hospedeiro-parasito) tendem a ser modulares por causa dos altos níveis de interação fisiológica e de dependência física ou trófica que levam a especialização evolutiva.

A terceira previsão sugere que os hospedeiros que compõem o espectro de uma espécie de parasito representam hospedeiros filogeneticamente próximos. A análise das redes ecológicas atuais mostra nove eventos de expansões na gama de hospedeiros, nos quais quatro ocorreram entre espécies hospedeiras filogeneticamente próximas e cinco ocorrendo em espécies hospedeiras filogeneticamente distantes. Os eventos de expansão para hospedeiros filogeneticamente próximos ocorreram todos em microbacias do Oeste, enquanto os eventos de expansão para espécies filogeneticamente distantes ocorreram em

microbacias do Norte. Portanto esse pressuposto, parece não ter suporte nos resultados desse estudo. Os resultados sugerem que a incorporação de hospedeiros por uma espécie de parasito não se limita a espécies de hospedeiros filogeneticamente próximas ao seu hospedeiro original.

Todos os novos compartilhamentos observados representaram baixos valores de prevalência, representando a sobrevivência dessas espécies de parasitos sob condições subótimas no novo hospedeiro. De acordo com Braga et al. (2014) linhagens que apresentam uma longa história evolutiva em comum, compartilham um maior número de gêneros de parasitos, o que sugere que trocas entre hospedeiros filogeneticamente próximos são mais propensas a ocorrer do que trocas entre hospedeiros filogeneticamente distantes (Braga et al., 2014, Wiens & Graham, 2005). Segundo esses autores, o relacionamento filogenético dos hospedeiros seria o mais importante preditor de compartilhamentos para as espécies de parasitos. Cada troca de hospedeiro inicia com a colonização ou expansão na gama de hospedeiro, combinado com a capacidade de usar tanto o hospedeiro ancestral quanto o recém colonizado (Hoberg & Brooks, 2015).

O mecanismo de “*stepping-stone*” foi sugerido por Braga et al. (2014) para explicar trocas de hospedeiros filogeneticamente distantes, “saltos” menores utilizando hospedeiros mais proximamente relacionados, aumentam a distância do hospedeiro original. Uma espécie de parasito pode ser especialista em um recurso plesiomórfico, compartilhado com espécies próximas de um determinado clado de parasito. Logo, uma espécie hospedeira que ocorre em mais de um local poderá ser compartilhada por duas ou mais espécies de parasitos diferentes, mas relacionadas filogeneticamente, não necessitando serem espécies irmãs (Hoberg & Brooks, 2008). Segundo os autores, quando olhamos pela perspectiva do hospedeiro, o recurso pode ser muito específico e ainda assim ser taxonomicamente e geograficamente generalizado entre as espécies essas espécies. Nesses casos um parasito pode compartilhar mais de uma espécie de hospedeiro mesmo estas não sendo irmãs. Segundo Malcicka et al. (2015), convergência evolutiva também seria um fator importante para definir os recursos necessários para a sobrevivência de uma linhagem de parasito. Os eventos de expansão na gama de hospedeiros observados nesse estudo entre espécies filogeneticamente distantes, provavelmente ocorreram devido a esse fator. O conservantismo filogenético, tanto de espécies de parasitos quanto de

hospedeiros criam uma grande arena para troca de hospedeiros, mesmo sem a evolução de novas capacidades para a utilização de novos hospedeiros (Hoberg & Brooks, 2008, Agosta & Klemens, 2008, Agosta et al., 2010).

A quarta e última previsão sugere que uma mesma espécie de parasito pode apresentar parâmetros ecológicos distintos em cada hospedeiro em comunidades compostas de diferentes recursos (hospedeiros) disponíveis. Essa previsão aborda a Teoria do Mosaico Geográfico de Coevolução (GMC) (Thompson, 2005). A GMC é considerada parte integrante do Paradigma de Estocolmo e descreve a existência de variações geográficas na compatibilidade entre as espécies de parasitos a um ou mais hospedeiro. Mosaicos macroevolutivos estão ligados a episódios de colonização, coespeciação e diversificação de fauna. A persistência de linhagens em períodos derivados de perturbações ecológicas irão envolver tanto processos de coevolução quanto de colonizações (Hoberg & Brooks, 2008).

O cladograma final obtido pelo PACT para as espécies de *Aglaiogyrodactylus*, *Phanerothecium* e *Onychogyrodactylus* e seus hospedeiros sugere cinco (*Rineloricaria* sp., *A. multispinis*, *P. cf. azygolechis*, *P. splendens* e *K. lacerta*) das seis espécies hospedeiras associadas com as espécies ovíparas de Gyrodactylidae como hospedeiros ancestrais desse sistema. A análise considerou nove eventos de isolamento, refletindo na diminuição da gama de espécies hospedeiras ancestrais para alguns girodactídeos e apenas um evento de expansão, aumentando a gama de hospedeiros ancestrais. Entretanto, no cladograma reproduzindo as áreas Oeste e Norte da Baía de Paranaguá apenas três eventos de isolamento de áreas foram compatíveis com os eventos de isolamento detectados no cladograma das espécies de girodactídeos e seus hospedeiros. A comparação dos dois cladogramas mostrou as espécies de *Aglaiogyrodactylus* ocorrendo em sua maioria na região Oeste da Baía, conseqüentemente os processos que ocasionaram no aumento da gama de hospedeiros para essas espécies ocorreram nessa região. No entanto espécies de *Phanerothecium* e *Onychogyrodactylus* apresentam distribuição mais uniforme no sistema, porem para as espécies de *Phanerothecium* o aumento na gama de hospedeiros foram observadas principalmente no Norte. As espécies de *Aglaiogyrodactylus* compartilharam principalmente espécies hospedeiras da subfamília Neoplecostominae (*K. lacerta*, *P. splendens* e *P. cf. azygolechis*), onde apresentaram maior valor de prevalência (acima de 0,5), apenas *A. guttus* ocorreu em

S. guntheri (Hypoptopomatinae). As espécies de *Aglaogyrodactylus* observadas compartilhando hospedeiros filogeneticamente distantes foram encontradas ocorrendo predominantemente em prevalências mais baixas. O mesmo padrão foi detectado para espécies de *Phanerothecium*, que em sua maioria ocorreram em *Rineloricaria* sp. (subfamília Loricariinae), quando compartilharam novas espécies hospedeiras sua ocorrência foi registrada em menor prevalência, essas associações ocorreram principalmente em espécies filogeneticamente distantes do seu hospedeiro original. Já as espécies de *Onychogyrodactylus* ocorreram apenas em *A. multispinis* em alta prevalência em todo o sistema estudado.

Quando comparamos os valores de prevalência de cada espécie de parasito em cada hospedeiro, por microbacia (Figura 21) podemos observar *A. forficuloides*, a qual apresenta como hospedeiro original *K. lacerta*, ocorreu em maior prevalência nesse hospedeiro nas microbacias do Oeste, enquanto sua associação com o mesmo em microbacias do Norte apresentou valores de prevalência mais baixos. O cenário contrário foi encontrado para *A. forficulatus*, que também compartilha *K. lacerta* como hospedeiro original. Essa espécie ocorreu em maior prevalência nesse mesmo hospedeiro nas microbacias do Norte, enquanto no Oeste sua associação com o mesmo foi representada em menor prevalência. As espécies de *Phanerothecium* sp. n. 1 e *Phanerothecium* sp. n. 3 ocorrem em *Rineloricaria* sp. (hospedeiro original) em maior prevalência em microbacias do Norte e menor prevalência em microbacias do Oeste. *Aglaogyrodactylus* sp. n. 4 apresentou expansão na sua gama de hospedeiros na ausência de seu hospedeiro original, interagindo com *A. multispinis* no Norte, essa associação apresentou prevalência significativamente maior do que a nova associação observada com *P. cf. azygolechis* no Oeste, espécie filogeneticamente próxima a seu hospedeiro original. As espécies *Aglaogyrodactylus* sp. n. 2 e *Aglaogyrodactylus* sp. n. 6, mostraram padrão de ocorrência significativamente menor quando comparado ao seu hospedeiro original/ancestral. As espécies vivíparas, que não foram representadas na análise do PACT, apresentaram valores semelhantes em todo o sistema. Apenas *Gyrodactylus* sp. n. 9 teve um padrão diferente pois apresentou alto valor de prevalência na microbacia do rio Tagaçaba (microbacia do Norte). Esse padrão de variações na compatibilidade com a espécie hospedeira está de acordo com o previsto pela Teoria do Mosaico Geográfico de Coevolução.

Uma vez que uma espécie de parasito esteja difundida em uma região geográfica e ou entre novos hospedeiros por *ecological fitting*, novas espécies especialistas podem surgir como proposto na hipótese de Oscilação (Nylín et al., 2014). Para que esses processos ocorram devemos observar um aumento na gama de hospedeiros utilizados (generalização), seguida por um aumento na compatibilidade (i.e. aumento da prevalência) denotando coadaptação das novas associações. Segundo a Teoria de Oscilação (Janz & Nylín, 2008; Nylín et al., 2014), os processos de expansão do espectro de hospedeiros podem gerar linhagens evolutivas em resposta a pequenas diferenças no recurso disponível por espécies de hospedeiros distantes, podendo ocasionar na origem de novas espécies.

Apesar da aparente variação detectada para as algumas espécies de parasitos, não foi possível detectar diferenciações conduzindo para a origem de novas linhagens de parasitos, como previsto pela Teoria do Mosaico Geográfico de Coevolução (Thompson, 2005). No entanto, os processos de expansão na gama de hospedeiro visualizadas nesse estudo, através da análise do PACT e ancestralidade, parecem indicar associações recentes, provavelmente derivadas dos últimos eventos eustáticos que afetaram a região.

Baseado nos dados obtidos por Tschá (2016), e dados empíricos coletados no presente estudo, a reconstrução das redes ecológicas ancestrais do sistema da Baía de Paranaguá sugere que as comunidades de hospedeiros e consequentemente seus parasitos encontravam-se amplamente distribuídas em uma grande bacia hidrográfica da baía de Paranaguá durante períodos pretéritos de baixo nível do mar, algo também detectado na reconstrução com o PACT. O evento de subida do nível do mar, o qual provavelmente isolou as populações nos contrafortes da Serra do Mar, promoveu redução de habitat. Nesse cenário, algumas espécies foram extintas, tanto hospedeiros quanto seus parasitos, refletindo no padrão de distribuição populacional que observamos atualmente.

O padrão encontrado no presente estudo corrobora com os resultados de Tschá (2016), que detectou fragmentação nas comunidades de três espécies de peixes da Baía de Paranaguá (incluídas no presente estudo). A diferenciação genética encontrada para essas espécies datam de períodos de isolamento das comunidades, onde o nível do mar encontrava-se a 8 m acima do nível atual, cerca de 123.000 anos atrás e 4,8 m há 5.100 anos atrás (Martin et al., 1996; Martin, 2003). A diferenciação

observada foi considerada resultado da mais recente transgressão marinha, associada com o fim do último período de glaciação, esses episódios alternados de expansão e isolamento das comunidades associados a flutuação do nível do mar é compatível com a hipótese de *Taxon pulse* proposta por Erwin (1985) e detectada por Tschá, 2016). Os episódios de expansão conduzem para o desenvolvimento de mosaicos ao longo do espaço e tempo como consequências de processos que guiam através de colonizações geográficas/hospedeiros, *ecological fitting* e troca de hospedeiro (Hoberg & Brooks, 2015). Consequentemente, eventos de expansão e isolamento (fragmentação) influenciaram na diferenciação das comunidades de peixes da Baía e, consequentemente, a estrutura das redes de interação nas microbacias resultantes.

Esse estudo utilizou como base teórica dois preceitos do Paradigma de Estocolmo para compreender as interações de um sistema complexo hospedeiro-parasito em um ambiente constantemente influenciado por eventos de variações ambientais. Como discutido ao longo desse capítulo, a colonização de novos hospedeiros não requer mudanças genéticas para as espécies de parasitos, suportando a importância de elementos do Paradigma de Estocolmo, tais como o *Ecological fitting* e o Mosaico Geográfico de Coevolução na dinâmica das associações.

V. Referências

- Agosta, S.J., 2006. On ecological fitting, plant-insect associations, herbivore host shifts, and host plant selection. *Oikos*, 114, 556-565.
- Agosta, S.J.; Klemens, J.A., 2008. Ecological fitting by phenotypically flexible genotypes: implications for species associations, community assembly and evolution. *Ecology Letters*, 11, 1123-1134.
- Agosta, S.J.; Jans, N.; Brooks, D.R., 2010. How generalists can be specialists: resolving the “parasite paradox” and implications for emerging disease. *Zoologia*, 27, 151-162.
- Anderson, R.M.; May, R.M. 1978. Regulation and Stability of host-Parasite population interactions: I. Regulatory processes. *The Journal of Animal Ecology*, 219-247.

- Angulo, R.J.; Lessa, G.C., 1997. The Brazilian sea-level curves: a critical review with emphasis on the curves from the Paranaguá and Cananéia regions. *Marine Geology*, 140, 141-166.
- Araujo, S.B.L.; Braga, M.P.; Brooks, D.R.; Agosta, S.J.; Hoberg, E.P.; Von Hartenthal, F.W.; Boeger, W.A., 2015. Understanding Host-Switching by Ecological Fitting. *PloS One*, 10, 10, 1-17.
- Bakke, T.A.; Harris, P.D.; Jansen, P.A.; Hansen, L.P., 1992. Host specificity and dispersal strategy in gyrodactylid monogeneans, with particular reference to *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea). *Diseases of Aquatic Organisms*, 13, 1, 63-74.
- Bascompte, J.; Jordano, P.; Melian, C.J.; Olesen, J.M., 2003. The nested assembly of plant–animal mutualistic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 9383-9387.
- Bellay, S.; Lima, Jr. D.P.; Takemoto, R.M.; Luque, J.L., 2011. A host-endoparasite network of Neotropical marine fish: are there organizational patterns? *Parasitology*, 138, 1945-1952.
- Bellay, S.; de Oliveira, E.F.; Almeida-Neto, M.; Junior, D.P.L.; Takemoto, R.M.; Luque, J.L., 2013. Developmental stage of parasites influences the structure of fish-parasite networks. *PloS One*, 8, 10, e75710.
- Bellay, S.; De Oliveira, E.F.; Almeida-Neto, M.; Mello, M.A.R.; Takemoto, R.M.; Luque, J.L., 2015. Ectoparasites and endoparasites of fish form networks with different structures. *Parasitology*, 142, 07, 901-909.
- Boeger, W.A.; Kritsky, D.C.; Pie, M.R., 2003. The context of diversification of the viviparous Gyrodactylidae. *Zoologica Scripta*, 32, 5, 437-448.
- Boeger, W.A.; Kritsky, D.C.; Pie, M.R.; Engers, K.B., 2005. Mode of transmission, host switching, and escape from the Red Queen by viviparous gyrodactylids (Monogenoidea). *Journal of Parasitology*, 91, 1000-1007.
- Blüthgen, N.; Menzel, F.; Blüthgen, N., 2006. Measuring specialization in species interaction networks. BMC [BioMed Central] *Ecology*, 6, 9.
- Blüthgen, N.; Fründ, J.; Vázquez, P.; Menzel, F., 2008. What do interaction network metrics tell us about specialization and biological traits. *Ecology*, 89, 12, 3387-3399.
- Braga, M.P.; Razzolini, E.; Boeger, W.A., 2014. Drivers of parasite sharing among Neotropical freshwater fishes. *Journal of Animal Ecology*, 84, 2, 487-497.

- Brooks DR, McLennan DA. 1991 Phylogeny, ecology, and behavior. Chicago, IL: University of Chicago Press. 24.
- Brooks DR, McLennan DA. 1993 Parascript: parasites and the language of evolution. Washington, DC: Smithsonian Institution Press.
- Brooks, D.R.; McLennan, D.A., 2002. The nature of diversity: an evolutionary voyage of discovery. *University of Chicago Press*, Chicago. 668p.
- Brooks, D.R., Dowling, A.P.G., van Veller, M.G.P., Hoberg, E.P., 2004. Ending a decade of deception: a valiant failure, a notso- valiant failure, and a success story. *Cladistics*, 20, 32-46.
- Brooks, D.R.; Ferrao, A.L., 2005. The historical biogeography of covevolution: emerging infectious diseases are evolutionary accidents waiting to happen. *Journal of Biogeography*, 32, 1291-1299.
- Brooks, D.R.; Leòn-Re`gagnon, V.; McLennan, D.A.; Zelmer, D., 2006. Ecological fitting as a determinant of the community structure of platyhelminth parasites of anurans. *Ecology*, 87, 76-85.
- Brooks, D.R.; Hoberg, E.P., 2007. How will global climate change affect parasite–host assemblages? *Trends in Parasitology*, 23, 571-574.
- Brooks, D.R.; Hoberg, E.P., 2013. The emerging infectious disease crisis and pathogen pollution: a question of ecology and evolution. In *The balance of nature and human impact* (ed. Rohde K), Cambridge, UK: Cambridge University Press, 215-229.
- Brooks, D.R.; Hoberg, E.P.; Boeger, W.A.; Gardner, S.L., Galbreath, K.E.; Herczeg, D.; Mejía-Madrid, H.H.; Rácz, S.E., Dursahinhan, A.T., 2014. Finding them before they find us: informatics, parasites, and environments in accelerating climate change. *Comparative Parasitology*, 81, 2, 155-164.
- Bueno-Silva, M.; Boeger, W.A., 2014. Neotropical Monogenoidea. 58. Three new species of *Gyrodactylus* (Gyrodactylidae) from *Scleromystax* spp. (Callichthyidae) and the proposal of COII gene as an additional fragmente for barcoding gyrodactylids. *Folia Parasitologica*, 61, 3, 213-222.
- Bush, A.O.; Lafferty, K.D.L.; Lotz, J.M.; Shostak, A.W., 1997. Parasitology meets ecology on terms: Margolis et al. Revisited. *Journal of Parasitology*, 83, 575-583.
- Chen, W.J.; Bonillo, C.; Lecointre, G., 2003. Repeatability of clades as a criterion of reliability: a case study for molecular phylogeny of Acanthomorpha (Teleostei) with larger number of taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26, 262-288.

- Clauset, A.; Moore, C.; Newman, M.E.J., 2008. Hierarchical structure and the prediction of missing links in networks. *Nature*, 453, 98-101.
- Correa, I.C., 1996. Les variations du niveau de la mer durant les derniers 17.500 ans BP: l' exemple de la plate-forme continentale du Rio Grande do Sul, Brésil. *Marine Geology*, 130, 163-178.
- Dormann, C. F.; Fründ, J.; Blüthgen, N.; Gruber, B., 2009. Indices, graphs and null models: analyzing bipartite ecological networks.
- Dormann, C. F.; Strauss, R., 2014. A method for detecting modules in quantitative bipartite networks. *Methods in Ecology and Evolution*, 5, 1, 90-98.
- Drummond, A.J.; Ashton, B.; Buxton, S.; Cheung, M.; Cooper, A.; Duran, C.; Field, M.; Heled, J.; Kearse, M.; Markowitz, S.; Moir, R.; Stones-Havas, S.; Sturrock, S.; Thierer, T.; Wilson, A., 2011. Geneious v5.4, Available from <http://www.geneious.com/>.
- Drummond, A.J.; Suchard, M.A.; Xie, D.; Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 *Molecular Biology And Evolution*, 29, 1969-1973.
- Erwin, T.L., 1985. The taxon pulse: a general pattern of lineage radiation and extinction among carabid beetles. *Taxonomy, phylogeny and zoogeography of beetles and ants*, 437-488.
- Fontaine, C.; Guimarães, P.R.; Kéfi, S.; Loeuille, N.; Memmott, J.; Van der Putten, W.H.; Van Veen, F.J.F.; Thébault, E., 2011. The ecological and evolutionary implications of merging different types of networks. *Ecology Letters*, 14, 1170-81.
- Fortuna, M.A.; Stouffer, D.B.; Olesen, J.M.; Jordano, P.; Mouillot, D.; Krasnov, B.R.; Poulin, R.; Bascompte, J., 2010. Nestedness versus modularity in ecological networks: two sides of the same coin? *Journal of Animal Ecology*, 79, 811-817.
- Gernhard, T., 2008. The conditioned reconstructed process. *Journal of theoretical biology*, 253, 4, 769-778.
- Gomulkiewicz, R.; Thompson, J.N.; Holt, R.D.; Nuismer, S.L.; Hochberg M.E., 2000. Hot Spots, Cold Spots, and the Geographic Mosaic Theory of Coevolution. *The American Naturalist*, 156, 2, 156-174.
- Graham, S.P.; Hassan, H.K.; Burkett-Cadena, N.D.; Guyer, C.; Unnasch, T.R., 2009. Nestedness of ectoparasite-vertebrate host networks. *PloS One*, 4, 11, e7873.

- Gregory, R.D.; Keymer, A.E.; Harvey, P.H., 1991. Life history, ecology and parasite community structure in Soviet birds. *Biological Journal of the Linnean Society*, 43, 4, 249-262.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic. Acids Symposium Er*, 41, 95-98.
- Hammer, Ø.; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D., 2001. PAST-PAlaeontological STatistics, ver. 1.89. *Palaeontologia electronica*, 4, 1, 1-9.
- Hoberg, E.P., 1995. Historical biogeography and modes of speciation across high-latitude seas of the Holarctic: concepts for host-parasite coevolution among the Phocini (Phocidae) and Tetrabothriidae (Eucestoda). *Canadian Journal of Zoology*, 73, 1, 45-57.
- Hoberg, E.P.; Brooks, D.R., 2008. A macroevolutionary mosaic: episodic host-switching, geographic colonization, and diversification in complex host-parasite systems. *Journal of Biogeography*, 35, 9, 1533-1550.
- Hoberg, E.P.; Brooks, D.R., 2010. Beyond vicariance: integrating taxon pulses, ecological fitting and oscillation in historical biogeography and evolution. *The geography of host-parasite interactions*, 7-20.
- Hoberg, E.P.; Brooks, D.R., 2015. Evolution in action: climate change, biodiversity dynamics and emerging infectious disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 370, 20130553.
- Humason, L., 1979. Animal Tissue Techniques. W.H. Freeman and Company, 4th ed. San Francisco, 661.
- Ivanova, N.V.; Zemlak, T.S.; Hanner, R.H.; Hebert, P.D.N., 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7, 544-548.
- Janz, N.; Nylin, S.; Nyblom, K., 2001. Evolutionary dynamics of host plant specialization: a case study of the tribe Nymphalini. *Evolution*, 55, 783-796.
- Janz, N.; Nylin, S., 2008. The oscillation hypothesis of host plant-range and speciation. In *Specialization, speciation, and radiation: the evolutionary biology of herbivorous insects* (ed. KJ Tilmon), 203-215.
- Janzen, D.H., 1985. On ecological fitting. *Oikos*, 45, 308-310.
- Kergoat, G.J.; Delobel, A.; Fediere, G.; Le Ru, B.; Silvain, J.F., 2005. Both host-plant phylogeny and chemistry have shaped the African seed-beetle radiation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35, 602-611.

- Kowsmann, R.O.; Costa, M.P.A., 1974. Paleolinhas de Costa na Plataforma Continental das regiões Sul e Norte Brasileiras. *Revista Brasileira de Geociências*, 4, 215-222.
- Krasnov, B.R.; Fortuna, M.A.; Mouillot, D.; Khokhlova, I.S.; Shenbrot, G.I.; Poulin, R., 2012. Phylogenetic signal in module composition and species connectivity in compartmentalized host-parasite networks. *The American Naturalist*, 179, 4, 501-511.
- Kritsky, D.C.; Stockwell, C.A., 2005. New species of *Gyrodactylus* (Monogeneoidea, Gyrodactylidae) from the white sands pupfish, *Cyprinodon tularosa*, in New Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 50, 312-317.
- Lieberman, B.S., 2000. Paleobiogeography. Plenum/Kluwer Academic, New York.
- Lieberman, B.S., 2003a. Paleobiogeography: the relevance of fossils to biogeography. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 34, 51-69.
- Lieberman, B.S., 2003b. Unifying theory and methodology in biogeography. *Evolutionary Biology*, 33, 1-25.
- Littlewood, D.T.J.; Bray, R.A., 2001. Interrelationships of the Platyhelminthes. *The Systematics Association Special*, 60, 1-356.
- Maddison, W.P.; Maddison, D.R., 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75, <http://mesquiteproject.org>.
- Malcicka, M.; Agosta, S.J.; Harvey, J.A., 2015. Multi level ecological fitting: indirect life cycles are not a barrier to host switching and invasion. *Global Change Biology*, 21, 9, n/a–n/a. <http://doi.org/10.1111/gcb.12928>.
- Martin, L.; Suguio, K.; Flexor, J.M.; Dominguez, J.M.L.; Bittencourt, A.C.S.P., 1996. Quaternary Sea-level history and variation in Dynamics along the central Brazilian coast: consequences on coastal plain construction. *Anais Academia Brasileira de Ciências*, 68, 303-354.
- Martin, L., 2003. Holocene sea-level history along eastern-southeastern Brazil. *Anuário do Instituto de Geociências*, 26, 13-24.
- Matějusková, I.; Gelnar, M.; McBeath, A.J.A.; Collins, C.M.; Cunningham, C.O., 2001. Molecular markers for gyrodactylids (Gyrodactylidae: Monogenea) from five fish families (Teleostei). *International Journal for Parasitology*, 31, 738-745.

- Miller, K.G.; Mountain, G.S.; Wright, J.D.; Browning, J.V., 2011. A 180-million record of sea level and ice volume variations from continental margin and deep-sea isotopic records. *Oceanography*, 24, 40-53.
- Montoya-Burgos, J.I., 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, 12, 7, 1855-1867.
- Nylin, S.; Slove J.; Janz, N., 2014. Host plant utilization, host range oscillations and diversification in nymphalid butterflies: a phylogenetic investigation. *Evolution*, 68, 105-124.
- Nyman, T., 2009. To speciate, or not to speciate? Resource heterogeneity, the subjectivity of similarity, and the macroevolutionary consequences of niche-width shifts in plantfeeding insects. *Biological Reviews*: doi: 10.1111/j.1469-185X.2009.00109.x
- Olesen, J.M.; Bascompte, J., Dupont, Y.L., Jordano, P., 2007. The modularity of pollination networks. *The modularity of pollination networks*, 104, 19891-19896.
- Olson, P.D.; Littlewood, D.T.J., 2002. Phylogenetics of the Monogenea—evidence from a medley of molecules. *International Journal for Parasitology*, 32, 3, 233-244.
- Page, R.D.M., 2003. Tangled trees: phylogeny, co-speciation and co-evolution. University of Chicago Press, Chicago.
- Palumbi, S.R., 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. *Molecular systematics*, 2, 1, 205-247.
- Penn, O.; Privman, E.; Ashkenazy, H.; Landan, G.; Graur, D.; Pupko, T., 2010. GUIDANCE: a web server for assessing alignment confidence scores. *Nucleic Acids Research*, Jul 1, 38 (Web Server issue), 23-28.
- Pimm, S.L., 1982. Food webs. London: Chapman & Hall. 219 p.
- Poulin, R., 1992. Determinants of host-specificity in parasites of freshwater fishes. *International Journal for Parasitology*, 22, 753-758.
- Poulin, R., 1995. Phylogeny, ecology, and the richness of parasite communities in vertebrates. *Ecological Monographs*, 65, 283-302.
- Poulin, R., 1998. Large-scale patterns of host use by parasites of freshwater fishes. *Ecology Letters*, 1, 118-128.
- Poulin, R., 1999. The intra- and interspecific relationships between abundance and distribution in helminth parasites of birds. *Journal of Animal Ecology*, 68, 719-725

- Poulin, R., 2010. Network analysis shining light on parasite ecology and diversity. *Trends in Parasitology*, 26, 492-498.
- Poulin, R.; Krasnov, B.R.; Pilosof, S.; Thieltges, D.W., 2013. Phylogeny determines the role of helminth parasites in intertidal food webs. *Journal of animal ecology*. DOI: 10.1111/1365-2656.12101.
- Proulx, R.S.; Promislow, D.E.L.; Phillips, P.C., 2005. Network thinking in ecology and evolution. *Trends in ecology & evolution*, 460, 345-353.
- R Development Core Team, 2011. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Shackleton, N.J., 1987. Oxygen isotopes, ice volume and sea level. *Quaternary Science Reviews*, 6, 183-190.
- Scheffer, S.J.; Wiegmann B.M., 2000. Molecular phylogenetics of the holly leaf miners (Diptera: Agromyzidae: *Phytomyza*): species limits, speciation, and dietary specialization. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1, 244-255.
- Schmid-Hempel, P., 2011. Evolutionary parasitology: the integrated study of infections, immunology, ecology and genetics. Oxford: Oxford University Press.
- Siddall, M.; Rohling, E.J.; Almogi-Labin, A.; Hemleben, C.; Meischner, D.; Schmelzer, I.; Smeed, D.A., 2003. Sea-level fluctuations during the last glacial cycle. *Nature*, 423, 853-858.
- Suguio, K.; Martin, L.; Bittencourt, A.C.S.P.; Dominguez, J.M.L.; Flexor, J.M.; Azevedo, A.E.G., 1985. Flutuações do nível relativo do mar durante o Quaternário Superior ao longo do litoral brasileiro e suas implicações na sedimentação costeira. *Revista Brasileira de Geociências*, 15, 273-286.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S., 2013. Mega 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.
- Thompson, J.N., 1994. The coevolutionary process. Chicago: University of Chicago Press. 376.

- Thompson, J.N., 1997. Evaluating the dynamics of coevolution among geographically structured populations. *Ecology*, 78, 6, 1619-1623.
- Thompson, J.N. 2005. The geographic mosaic of coevolution. Chicago: University of Chicago Press. 400.
- Toft, C.A., 1986. Communities of parasites with parasitic life-styles. In Community ecology. Edited by: Diamond JM. Case TJ: Harper, 445-463.
- Tschá, M.K., 2016. Taxon Pulse: Um modelo para a diversificação genética de peixes em bacias hidrográficas costeiras. 110 p. Tese (Doutorado em Zoologia) – Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Villesen, P., 2007. FaBox: an online toolbox for fasta sequences. *Molecular Ecology Notes*, 7, 6, 965-968. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01821.x.
- Yotoko, K.S.C.; Prado, P.I.; Russo, C.A.M.; Solferini, V.N., 2005. Testing the trend towards specialization in herbivore-host plant associations using a molecular phylogeny of *Tomoplaga* (Diptera: Tephritidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35, 701-711.
- Weitzman, S.H.; Menezes, N.A.; Weitzman, M.J., 1988. Phylogenetic biogeography of the glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. In *Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns* (Vanzolini, P. E. & Heyer, W. R., eds), pp. 379-427. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências.
- Wiens, J.J.; Graham, C.H., 2005. Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 519-539.
- Wojcicki, M.; Brooks, D.R., 2004. Escaping the matrix: a new algorithm for phylogenetic comparative studies of co-evolution. *Cladistics*, 20, 4, 341-361.
- Wojcicki, M., Brooks, D.R., 2005. PACT: an efficient and powerful algorithm for generating area cladograms. *Journal of Biogeography*, 32, 755-774.
- Ziętara, M.S.; Lumme, J., 2002. Speciation by host switch and adaptive radiation in a fish parasite genus *Gyrodactylus* (Monogenea, Gyrodactylidae). *Evolution*, 56, 2445-2458.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo avaliou a estrutura de comunidades de hospedeiros e seus parasitos da planície costeira do Paraná. Em um primeiro momento, a composição da fauna de Gyrodactylidae foi definida e sua confirmação taxonômica conferida a ferramentas morfológicas e moleculares. O estudo identificou 22 espécies de Gyrodactylidae, sendo oito novas espécies propostas para o grupo ovíparo de Gyrodactylidae e três novas espécies propostas para o clado vivíparo. Considerando, o baixo número de espécies descritas para o grupo ovíparo, de aproximadamente 23 espécies (Kritsky et al., 2007), este estudo contribuirá significativamente com a descrição de novas espécies. Em contrapartida, será fornecido novas sequências de espécies de Gyrodactylidae encontradas exclusivamente na região Neotropical.

Para compreender a distribuição e associações entre parasitos e seus hospedeiros, este estudo analisou a interação entre espécies de *Aglaogyrodactylus* e seus hospedeiros, coletados em um trecho do rio Marumbi. A avaliação do hospedeiro ancestral desse sistema indicou três espécies de Loricariidae como espécies ancestrais do clado de *Aglaogyrodactylus*. Entretanto, as espécies de *Aglaogyrodactylus* apresentaram expansões na gama de hospedeiro diferenciada, um primeiro grupo de espécies manteve-se praticamente ocorrendo nas espécies hospedeiras ancestrais do grupo, expandindo para algumas poucas novas espécies, enquanto o segundo grupo, deixou de interagir com as espécies hospedeiras ancestrais, expandindo sua gama para hospedeiros filogeneticamente próximos. A oportunidade oferecida pelo sistema para novas associações e a compatibilidade de realizar e manter novas associações através do *ecological fitting* (Araujo et al., 2015), foram determinantes para o cenário observado nesse trecho do rio Marumbi.

Finalmente, esse cenário foi ampliado para oito microbacias da Baía de Paranaguá utilizando um modelo com dados empíricos que mostrou linhagens de parasitos persistindo em determinados ambientes associando-se a espécies hospedeiras com recursos compatíveis ao seu hospedeiro original/ancestral, sendo elas filogeneticamente próximas ou não. Hoberg e Brooks (2008), sugerem que a capacidade de sobrevivência de uma ou mais linhagens de parasitos aumenta quando essas espécies apresentam capacidade de utilizar vários hospedeiros na ausência de seu hospedeiro original.

Seguindo o pressuposto adotado no presente estudo de que todas as espécies do sistema hospedeiro-parasito, já se encontravam presentes na Baía antes da influência de eventos da variação no nível do mar. Durante períodos de baixa do nível do mar (aproximadamente 130 m do nível atual) a cerca de 18.000 anos atrás (Kowsmann & Costa, 1974; Correa, 1996) as comunidades de peixes e consequentemente seus parasitos passaram por processos de mistura entre as populações (expansão de área). Esses eventos apresentaram oportunidade para a dispersão das espécies em um sistema de única paleobacia. No entanto, quando o nível do mar estava 10 m acima do atual (aproximadamente 120.000 anos atrás) e 5,3 m há 5.100 anos (Suguió et al., 1985; Martin et al., 1996; Angulo & Lessa, 1997; Martin, 2003) essas populações foram isoladas causando, provavelmente, extinções locais tanto de espécies hospedeiras quanto de seus parasitos. As comunidades analisadas apresentaram padrão de estruturação diferenciado entre comunidades de hospedeiros e parasitos encontradas em microbacias do Oeste e Norte da Baía, provavelmente decorrentes desses eventos como obtido por Tschá (2016).

A variação no padrão da prevalência observada em algumas espécies de parasito indica uma variação na compatibilidade com seu hospedeiro em diferentes regiões geográfica (Baía de Paranaguá), como previsto pela Teoria do Mosaico Geográfico de Coevolução. Entretanto, essas diferenças não revelaram diferenciação originando novas linhagens de parasitos na comunidade da Baía. A colonização de novos hospedeiros e a expansão na gama de hospedeiros para as espécies de parasitos são eventos decorrentes da capacidade de aproveitar a oportunidade e interagir com novas espécies oferecida pelo sistema.

Os processos derivados de oscilação na gama de hospedeiros e pulsos de diversificação de táxons, previstos por outros dois componentes do Paradigma de Estocolmo (Hipótese de Oscilação e Taxon pulse), não foram observados nesse estudo. As linhagens de parasitos estudadas parecem ser mais antigas do que as linhagens de seus hospedeiros. Os resultados obtidos pelo PACT e pela reconstrução das redes ancestrais desse sistema, indicam que as espécies de hospedeiros e parasitos provavelmente encontravam-se distribuídas em todo o sistema da Baía, assim. A persistência de algumas linhagens de parasitos seria resultado de episódios de colonização de novos hospedeiros devido à extinção local dos mesmos.

A colonização de novos hospedeiros é prevista pelo Paradigma de Estocolmo como eventos frequentes no ambiente. Compreender como esses processos são formados, e como se mantêm torna-se cada vez mais importantes para desvendar as novas associações, incluindo associações envolvendo patógenos transmissores de doenças emergentes (Brooks et al., 2014). As associações entre hospedeiros parasitos e patógenos tem sido muitas vezes vinculadas a perturbações ecológicas seguidas de colonizações geográficas e de novos hospedeiros em diferentes escalas espaciais e temporais ao longo da história (Hoberg & Brooks, 2008, 2010, Brooks et al., 2014). As interações observadas nesse estudo refletem a eficácia na sobrevivência de espécies de parasitos no ambiente, contribuindo com evidências para as previsões do Paradigma de Estocolmo.

REFERÊNCIAS

- Angulo, R.J.; Lessa, G.C., 1997. The Brazilian sea-level curves: a critical review with emphasis on the curves from the Paranaguá and Cananéia regions. *Marine Geology*, 140, 141-166.
- Araujo, S.B.L.; Braga, M.P.; Brooks, D.R., Agosta, S.J.; Hoberg, E.P.; Von Hartenthal, F.W., Boeger, W.A., 2015. Understanding Host-Switching by Ecological Fitting. *PloS One*, 10, 10, 1-17.
- Brooks, D.R.; Hoberg, E.P.; Boeger, W.A.; Gardner, S.L., Galbreath, K.E.; Herczeg, D.; Mejía-Madrid, H.H.; Rácz, S.E., Dursahinhan, A.T., 2014. Finding them before they find us: informatics, parasites, and environments in accelerating climate change. *Comparative Parasitology*, 81, 2, 155-164.
- Correa, I.C., 1996. Les variations du niveau de la mer durant les derniers 17.500 ans BP: l' exemple de la plate-forme continentale du Rio Grande do Sul, Brésil. *Marine Geology*, 130, 163-178.
- Hoberg, E.P.; Brooks, D.R., 2008. A macroevolutionary mosaic: episodic host-switching, geographic colonization, and diversification in complex host-parasite systems. *Journal of Biogeography*, 35, 9, 1533-1550.

- Hoberg, E.P.; Brooks, D.R., 2010. Beyond vicariance: integrating taxon pulses, ecological fitting and oscillation in historical biogeography and evolution. *The geography of host–parasite interactions*, 7-20.
- Kowsmann, R.O.; Costa, M.P.A., 1974. Paleolinhas de Costa na Plataforma Continental das regiões Sul e Norte Brasileiras. *Revista Brasileira de Geociências*, 4, 215-222.
- Kritsky, D.C.; Vianna, R.T.; Boeger, A., 2007. Neotropical Monogenoidea. 50. Oviparous gyrodactylids from loricariid and pimelodid catfishes in Brazil, with the proposal of *Phanerothecioides* n. g., *Onychogyrodactylus* n. g. and *Aglaigyrodactylus* n. g. (Polyonchoinea: Gyrodactylidea). *Systematic Parasitology*, 66, 1-34.
- Martin, L.; Suguio, K.; Flexor, J.M.; Dominguez, J.M.L.; Bittencourt, A.C.S.P., 1996. Quaternary Sea-level history and variation in Dynamics along the central Brazilian coast: consequences on coastal plain construction. *Anais Academia Brasileira de Ciências*, 68, 303-354.
- Martin, L., 2003. Holocene sea-level history along eastern-southeastern Brazil. *Anuário do Instituto de Geociências*, 26, 13-24.
- Suguio, K.; Martin, L.; Bittencourt, A.C.S.P.; Dominguez, J.M.L.; Flexor, J.M.; Azevedo, A.E.G., 1985. Flutuações do nível relativo do mar durante o Quaternário Superior ao longo do litoral brasileiro e suas implicações na sedimentação costeira. *Revista Brasileira de Geociências*, 15, 273-286.
- Tschá, M.K., 2016. Taxon Pulse: Um modelo para a diversificação genética de peixes em bacias hidrográficas costeiras. 110 p. Tese (Doutorado em Zoologia) – Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.